

SÉRIE A, N° 1546

N° D'ORDRE :

2412

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

J. POCHON

DOCTEUR EN MÉDECINE
ASSISTANT A L'INSTITUT PASTEUR

1^{re} THÈSE. — RÔLE D'UNE BACTÉRIE CELLULOLYTIQUE DE LA PANSE
Plectridium cellulolyticum (n. sp.) DANS LA DIGESTION
DE LA CELLULOSE CHEZ LES RUMINANTS.

2^e THÈSE. — LES CELLULASES DANS LA SÉRIE ANIMALE.

Soutenues le **9 MAI 1935** devant la Commission d'examen

MM. CAULLERY . . .	Président.
PORTIER . . .	} Assesseurs.
JAVILLIER . . .	

Travail du laboratoire de l'Évolution et de l'Institut Pasteur.

LAVAL
IMPRIMERIE BARNÉOUD

1935

SÉRIE A, N° 1546

N° D'ORDRE :

2412

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

J. POCHON

DOCTEUR EN MÉDECINE
ASSISTANT A L'INSTITUT PASTEUR

1^{re} THÈSE. — RÔLE D'UNE BACTÉRIE CELLULOLYTIQUE DE LA PANSE
Plectridium cellulolyticum (n. sp.) DANS LA DIGESTION
DE LA CELLULOSE CHEZ LES RUMINANTS.

2^e THÈSE. — LES CELLULASES DANS LA SÉRIE ANIMALE.

Soutenues le **9 MAI 1935** devant la Commission d'examen

MM. CAULLERY . . .	President.
PORTIER . . .	} Assesseurs.
JAVILLIER . . .	

Travail du laboratoire de l'Evolution et de l'Institut Pasteur.

LAVAL
IMPRIMERIE BARNÉOUD

1935

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire..... M. MOLLIARD.
Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

Professeurs honoraire	H. LE CHATELIER.	Léon BRILLOUIN.	AUGER.
	H. LEBESGUE.	GOURSAT.	BLAISE.
	A. FERNBACH.	WALLERANT.	DANGEARD.
	A. LEDUC.	GUILLET.	JANET.
	Émile PICARD.	PÉCHARD.	LESPIEAU.
	Rémy PERRIER.	FREUNDLER.	MARCHIS.
			MOUTON.

PROFESSEURS

G. BERTRAND.....	† Chimie biologique.	A. DUFOUR.....	† Physique. P. C. B.
M. CAULLERY.....	† Zoologie (Évolution des êtres organisés).	L. DUNOYER.....	Optique appliquée.
G. URBAIN.....	† Chimie générale.	A. GUILLERMOND.	† Botanique. P. C. B.
Émile BOREL.....	† Calcul des probabilités et Physique mathématique.	M. JAVILLIER.....	Chimie biologique.
Jean PERRIN.....	† Chimie physique.	L. JOLEAUD.....	Paléontologie.
H. ABRAHAM.....	† Physique.	ROBERT-LÉVY.....	Zoologie.
E. CARTAN.....	† Géométrie supérieure.	F. PICARD.....	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
M. MOLLIARD.....	† Physiologie végétale.	Henri VILLAT.....	† Mécanique des fluides et applications.
L. LAPICQUE.....	† Physiologie générale.	Ch. JACOB.....	† Géologie.
E. VESSIOT.....	† Mécanique analytique et Mécanique céleste.	P. PASCAL.....	† Chimie minérale.
A. COTTON.....	† Recherches physiques.	M. FRÉCHET.....	† Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
J. DRACH.....	† Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	E. ESCLANGON....	† Astronomie.
Charles FABRY....	† Enseignement de physique.	M ^{me} RAMART-LUCAS	† Chimie organique.
Charles PÉREZ....	† Zoologie.	H. BEGHIN.....	† Mécanique physique et expérimentale.
Léon BERTRAND ..	† Géologie structurale et géologie appliquée.	FOCH.....	Mécanique expérimentale des fluides.
P. PORTIER.....	† Physiologie comparée.	PAUTHENIER.....	Physique. P. C. B.
E. RABAUD.....	† Biologie expérimentale.	De BROGLIE.....	† Théories physiques.
M. GUICHARD.....	Chimie minérale.	CHRÉTIEN.....	Optique appliquée.
Paul MONTEL.....	† Théorie des fonctions et théorie des transformations.	P. JOB.....	Chimie générale.
P. WINTREBERT..	† Anatomie et histologie comparées.	LABROUSTE.....	Physique du Globe.
L. BLARINGHEM ..	† Botanique.	PRENANT.....	Zoologie.
O. DUBOSQ.....	† Biologie maritime.	VILLEY.....	Mécanique physique et expérimentale.
G. JULIA.....	† Application de l'analyse à la géométrie.	BOHN.....	Zoologie. P. C. B.
C. MAUGUIN.....	† Minéralogie.	COMBES.....	Botanique.
A. MICHEL-LÉVY.	Pétrographie.	GARNIER.....	Calcul différentiel.
H. BÉNARD.....	† Mécanique expérimentale des fluides.	PÈRES.....	Mécanique des fluides.
A. DENJOY.....	† Calcul différentiel et calcul intégral.	HACKSPILL.....	Chimie. P. C. B.
L. LUTAUD.....	† Géographie physique et géologie dynamique.	LAUGIER.....	Physiologie générale.
Eugène BLOCH....	† Physique théorique et physique céleste.	TOUSSAINT.....	Technique Aéronautique.
G. BRUHAT.....	Physique.	M. CURIE.....	Physique. P. C. B.
E. DARMOIS.....	Physique.	G. RIBAUD.....	† Hautes températures.
A. DEBIERNE.....	† Physique générale et Radioactivité.	CHAZY.....	† Mécanique rationnelle.
		GAULT.....	Chimie. P. C. B.
		CROZE.....	Physique.
		DUPONT.....	† Théories chimiques.
		LANQUINE.....	Géologie.
		VALIRON.....	Mathématiques.

Secrétaire..... A. PACAUD.
Secrétaire honoraire..... D. TOMBECK.



INTRODUCTION

Le double problème de la digestion de la cellulose et de la nutrition des Ruminants se présente sous un aspect complexe.

Le fait établi depuis longtemps est la digestibilité même de la cellulose. Celle-ci est à la base de l'alimentation des Ruminants. La ration protéique, d'une part, fournie par le protoplasme intracellulaire des plantes jeunes et par le volume relativement considérable des Infusoires de la panse, et la ration amylacée, d'autre part, adjointe en proportion variable à la ration de la cellulose, ne représentent qu'une faible partie de la ration alimentaire totale.

D'ailleurs, après HAUBNER, un grand nombre de travaux avaient démontré expérimentalement, par dosage comparé de la cellulose ingérée et de celle retrouvée dans les excréta, qu'une proportion plus ou moins grande de cellulose disparaissait pendant la traversée du tube digestif, proportion variable avec le degré de pureté de la cellulose ingérée.

C'est là le fait certain, le fait de base dont il fallait partir pour les recherches ultérieures et qu'il fallait expliquer.

Or, si un certain nombre d'animaux, en particulier l'escargot, sécrètent des diastases susceptibles de digérer la cellulose, on ne peut mettre en évidence, dans aucun des sucs digestifs des Ruminants, une propriété analogue. De plus, les cellulases contenues dans les plantes mêmes et libérées dans le tube digestif ne peuvent suffire à expliquer la digestion de la cellulose.

On reconnut que les microorganismes qui pullulent dans la panse devaient jouer un rôle important. On discuta le rôle respectif des Champignons, des Actinomycètes, des Infusoires et surtout des Bactéries ; de fait, on démontra expérimentalement le pouvoir cellulolytique du contenu de la panse et l'analyse chimique de ce contenu y montra la présence d'acides acycliques et de gaz, produits du métabolisme de la fermenta-

tion de la cellulose. Cependant le rôle respectif de ces divers organismes est encore discuté. Mais c'est au groupe des Bactéries que l'on attribua d'emblée la plus grande importance.

C'est que la flore cellulolytique du sol et des fumiers était depuis longtemps connue et que, dans les essais de fermentation *in vitro*, à partir du contenu de la panse, les bactéries jouaient un rôle prépondérant. Mais, à l'intérieur même du groupe des Bactéries, il était difficile de préciser quelles espèces étaient directement responsables de la fermentation. C'est que, à côté d'innombrables saprophytes, la flore cellulolytique y est représentée par une multitude d'espèces aérobies, anaérobies, thermophiles et que, si l'ensemble de ces bactéries réalisait *in vitro* la cellulolyse, l'isolement, en culture pure, d'une espèce cellulolytique stable avait toujours été infructueux. Aussi bien, certains auteurs pensent-ils qu'une symbiose de germes est nécessaire.

Ainsi, donc, un certain degré d'inconnu persiste dans le mécanisme même de la digestion.

Quant au problème de la nutrition des Ruminants, il y a ici encore, un fait sûr, dont il faut partir : la valeur énergétique de la cellulose, au point de vue alimentaire est, pour le Ruminant, la même que celle de l'amidon.

Or, les produits d'hydrolyse de ce dernier, le maltose et le glucose, sont en effet directement assimilables et énergétiques. Il n'en est pas de même pour la cellulose dont les seuls produits de dégradation connus furent pendant longtemps les acides acycliques et les gaz. L'hydrolyse chimique conduisait bien à d'autres corps, à des polyoses plus ou moins complexes, mais l'hydrolyse bactérienne, la seule intéressante, n'en donnait jamais trace. Puis divers auteurs démontrèrent que, dans certaines conditions, une fermentation microbienne était susceptible de former du cellobiose et du glucose. Mais il s'agissait soit de fermentation par bactéries thermophiles, soit de fermentations traitées de façon tout à fait artificielle par les antiseptiques (L'importance de ce fait est d'ailleurs considérable, au point de vue théorique, puisque le cellobiose, terme intermédiaire de dégradation de la cellulose, n'avait jusqu'alors été obtenu qu'indirectement, par acétolyse).

Le problème de la nutrition des Ruminants se heurte donc à un dilemme.

Ou bien il faut admettre la nutrition à partir des seuls acides acycliques : hypothèse bien invraisemblable.

Ou bien il faut admettre, ce qui est plus logique, que des sucres intermédiaires se forment dans le tube digestif, par un mécanisme analogue à celui réalisé au laboratoire par arrêt des cultures au moyen d'antiseptiques ; mais ce mécanisme reste à déterminer.

Nous avons, dans ce travail, essayé d'élucider ces différents points. Aussi bien les résultats que nous apportons et qui, selon nous, permettent d'expliquer en partie le mécanisme de la digestion et de la nutrition, demandent-ils, au point de vue physiologique, de nombreuses vérifications sur l'animal, et, au point de vue chimique, une étude plus approfondie du phénomène diastasique que nous croyons avoir mis en évidence.

Au point de vue historique il ne saurait être question d'étudier ici l'ensemble des travaux bactériologiques, protistologiques, mycologiques et biochimiques qui se rattachent, de près ou de loin, au problème de la cellulolyse. Nous indiquons seulement dans chacun de ces domaines les recherches d'ordre biologique qui permettent de préciser ou de résoudre la question de la digestion et de la nutrition des Ruminants. En particulier, dans le domaine très vaste de la flore cellulolytique bactérienne, notre fil directeur sera surtout d'ordre physiologique : il s'agit surtout de savoir quelles sont, de par leurs propriétés biologiques, les bactéries qui sont aptes à jouer un rôle effectif dans la digestion de la cellulose, celles qui ne peuvent être que des saprophytes ; celles enfin, qui ne peuvent même pas proliférer dans le tube digestif.

Nous tenons à assurer ici M. le Professeur CAULLERY qui nous a accueilli dans son laboratoire, où ces recherches ont été commencées, et qui nous a depuis constamment guidé, de notre respectueuse reconnaissance.

Nous exprimons notre sincère et respectueuse gratitude à M. le Docteur L. MARTIN qui a bien voulu nous admettre à l'Institut Pasteur et assurer la publication de cette thèse.

Nous exprimons nos respectueux remerciements à M. le Professeur F. MESNIL qui a bien voulu s'intéresser à notre travail et à sa publication.

Nous remercions très vivement M. le Docteur COTONI qui, depuis que nous travaillons dans son laboratoire, nous a, avec une grande bienveillance, facilité la poursuite de ces recherches.

Nous remercions également M. R. WEILL qui a orienté notre travail ainsi que M. le Docteur A.-R. PRÉVOT et M. le Docteur A. BERTHELOT, dont les précieux conseils nous ont constamment guidé; qu'ils trouvent ici l'expression de toute notre reconnaissance.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

DIGESTIBILITÉ DE LA CELLULOSE

Depuis HAUBNER qui, en 1855, démontra que le bœuf est capable de digérer la cellulose, toute une série de travaux ont vérifié le fait et apporté des précisions sur le taux de cellulose digérée et sur ses variations.

Nous ne pouvons ici que résumer brièvement le principe des méthodes expérimentales et l'essentiel des résultats de ces travaux, renvoyant, pour leur étude détaillée, au travail de Y. KHOUVINE.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES. — Le principe est toujours le même : faire ingérer à l'animal une quantité connue de cellulose et doser dans les excréta la quantité de cellulose retrouvée. La difficulté réside justement dans le dosage de la cellulose.

Il faut, en effet, tenir compte du fait que la cellulose des plantes n'est pas pure mais mélangée à des matières incrustantes plus ou moins résistantes. Les méthodes de dosage auront pour but, les unes, de rechercher la cellulose *brute*, corps mal défini, les autres, la cellulose *proprement dite*.

Le principe du dosage de la cellulose brute (HENNEBERG-STOHMANN, 1859) est le suivant : la substance sèche à analyser est épuisée par l'éther puis traitée successivement par de l'acide sulfurique à 1,25 p. 100 à chaud, par de la lessive de potasse à 1,25 p. 100 ; puis elle est lavée à l'eau, à l'éther et à l'alcool. Le résidu est pesé puis calciné. Les cendres sont pesées. La différence des deux poids indique la quantité de cellulose brute contenue dans la prise d'essai.

Cette méthode a subi par la suite de nombreuses modifications pour la rendre plus rapide et plus pratique. Les résultats en sont souvent difficiles à interpréter, car les matières albuminoïdes ne sont pas entièrement dissoutes et certains auteurs (MANN, 1899) ont proposé de faire un dosage correctif d'azote dans le résidu, ou encore (HAIGH, 1920) de faire subir à la matière à analyser une digestion pepsique avant le début du dosage.

La plupart des méthodes de dosage de la cellulose pure utilisent l'action du chlore sur la matière à analyser. SCHULZE (1857) fait agir à 15°, pendant quinze jours, un mélange d'acide nitrique et de chlorate de potassium; HOFMEISTER (1888) un mélange d'acide chlorhydrique et de chlorate de potassium pendant 24 heures.

Cependant d'autres méthodes (SIMON et LOHRISCH, 1904) utilisent le fait que les substances incrustantes sont détruites par les alcalis en fusion tandis que la cellulose n'est que dissoute. On récupère ensuite la cellulose dissoute en la précipitant par l'alcool.

RÉSULTATS. — D'une manière générale, le fait que les Ruminants digèrent la cellulose est établi; mais le taux de cette digestion est très variable. Les coefficients extrêmes vont de 36 p. 100 à 100 p. 100.

Il est d'ailleurs souvent difficile de déterminer exactement la durée du transit digestif en raison de la longueur de l'intestin des Ruminants. Aussi est-il nécessaire de mettre les animaux au régime que l'on désire étudier, plusieurs jours avant le début de l'expérience.

Les essais ont été faits sur le bœuf (HAUBNER-HENNEBERG et STOHHMANN-KÜHN, ARONSTEIN et SCHULZE-KÜHN et FLEISCHER); sur la chèvre (STOHHMANN-WILSING) et sur le mouton (HOFMEISTER-HENNEBERG-WEISKE-SCHULZE et FLEISCHIG-STOHHMANN). Il n'a pas été démontré qu'une espèce plutôt qu'une autre soit plus apte à digérer la cellulose, non plus qu'une race plutôt qu'une autre (HOFMEISTER-WEISKE).

L'âge des animaux ne semble jouer aucun rôle; toutefois ENZEMANN pense que les animaux jeunes digèrent moins bien la cellulose.

Par contre l'état des aliments a une grande importance : le coefficient de digestibilité le plus élevé est donné par LEHMANN et VOGEL qui le trouvent être de 100 p. 100, chez le mouton, pour le navet. Le plus bas, au contraire, est relevé par HENNEBERG et STOHMANN, chez le bœuf, pour la paille de riz.

Ainsi l'opposition est très nette entre la digestibilité des plantes jeunes (cellulose non incrustée) et celle des plantes âgées et séchées (cellulose imprégnée de matières incrustantes). Alors que, dans le premier cas, le coefficient oscille autour de 70 p. 100, il dépasse rarement 50 p. 100 dans le second. Le fait est d'autant plus important que la baisse du taux de digestibilité de la cellulose entraîne une baisse corrélative des autres constituants de la plante (éléments enfermés à l'intérieur des parois cellulodiques des cellules). WOODMAN donne le tableau suivant :

	Plante jeune Coefficient de digestibilité	Foin sec Coefficient de digestibilité
Cellulose.	84 p. 100	52 p. 100
Amidon	87 —	53 —
Protides	85 —	50 —
Lipides	60 —	30 —

L'importance de ces substances incrustantes a été mise en évidence, entre autres, par GODDEN W. : un mouton est nourri avec de la paille normale ; un autre avec de la paille traitée par de la lessive de soude (détruisant la lignine). Les coefficients de digestibilité sont relativement de 60 p. 100 et de 87 p. 100. Mais le phénomène a surtout été étudié par KELLNER et par WOODMAN et ses collaborateurs.

KELLNER, en particulier, en traitant de la paille, finement broyée, par une solution aqueuse contenant de la soude, du carbonate, du sulfite et du thyosulfate de sodium, pendant 3 h. 1/2 sous 7 atmosphères, obtient une cellulose dont le coefficient de digestibilité, chez le mouton, est de 95 p. 100.

Cependant, lorsque la paille est présentée sous une forme finement divisée, sans autre traitement, le coefficient de digestibilité augmente : 60 p. 100 pour la paille d'orge pulvérisée, chez le mouton (HENNEBERG et PFEIFFER).

D'autre part, l'adjonction d'amidon en grande quantité à la ration alimentaire semble faire baisser le coefficient de digesti-

bilité de la cellulose. En particulier LEHMAN et VOGEL donnent le chiffre de 34,3 p. 100 pour la farine de riz (pauvre en cellulose, riche en amidon). Le fait, d'ailleurs, affirmé par certains auteurs, est nié par d'autres.

Dans certains cas, l'adjonction d'huile à la ration de cellulose semble faire augmenter sa digestibilité (HOFMEISTER); l'adjonction d'acide sulfurique dilué n'a aucune action (WEISKE).

Enfin nous retiendrons un fait intéressant car il se rapproche, par certains côtés, des expériences faites, *in vitro*, au laboratoire. THOMAS et PRINGSHEIM ont nourri un mouton avec du papier. Le coefficient de digestibilité était de 59 p. 100. Nous remarquerons tout d'abord que cette cellulose pure est utilisable *in vivo* comme *in vitro* : ensuite que la totalité de la cellulose est loin d'être détruite et qu'ainsi il ne faut pas trop demander aux expériences *in vitro*. Ce fait enlève également à ces dernières le caractère un peu artificiel qu'on pourrait leur reprocher.

CHAPITRE II

MÉCANISME BIOLOGIQUE DE LA DIGESTION DE LA CELLULOSE

Les travaux qui viennent d'être brièvement résumés attestent donc la digestibilité de la cellulose. Les Ruminants l'utilisent dans une proportion, variable suivant l'état de la cellulose, établie entre 40 et 100 p. 100 environ.

Le mécanisme de la digestion pouvait, *a priori*, s'expliquer de plusieurs façons : ou bien la cellulose est attaquée par les ferments digestifs sécrétés par le Ruminant ; ou bien les diastases contenues dans les plantes ingérées, libérées au cours de la mastication, hydrolysent la cellulose ; ou bien enfin ce sont les micro-organismes du tube digestif qui font fermenter la cellulose et il y a ultérieurement absorption et assimilation des produits secondaires de cette fermentation.

Nous considérerons comme acquis le fait, que ni le premier, ni le second de ces processus ne peuvent être retenus. Voici cependant le principe général des expériences de nombreux auteurs qui ont établi le fait.

INEXISTENCE DE CELLULASE SÉCRÉTÉE PAR LES RUMINANTS. — La technique la plus souvent utilisée a été la suivante : on fait agir les divers sucs digestifs sur de la cellulose (salive, suc gastrique, suc pancréatique, bile, suc intestinal dans les différentes portions de l'intestin). Ou bien encore on utilise des extraits de muqueuses des différents segments du tube digestif ou du parenchyme des glandes annexes. Les résultats sont constamment négatifs. Il est cependant essentiel d'utiliser des extraits stériles, filtrés sur bougie ou phéniqués, afin d'éviter une cause d'erreur : l'action des bactéries cellulolytiques (HOFMEISTER).

Dans ces conditions, HOFMEISTER (avec la salive, les extraits

de panse et de cæcum de mouton), BERGMANN (avec le suc intestinal et l'extrait de muqueuse intestinale de mouton), ELLENBERGER surtout (salive, extrait intestinal, pancréatique, bile, extrait de panse, de caillette, de feuillet, de muqueuse œsophagienne, d'organes lymphoïdes) n'ont jamais pu mettre en évidence de cellulase.

INSUFFISANCE DES CELLULASES VÉGÉTALES. — Ce second point a été établi de deux façons différentes. Les aliments donnés habituellement aux Ruminants sont broyés et mis à l'étuve à 37°. Les dosages de cellulose, faits avant et après l'essai de fermentation, ne mettent jamais en évidence une destruction, même faible, de cellulose (SCHEUNERT et GRIMMER).

Ou bien encore on recherche l'action, sur la cellulose, du filtrat de contenu de panse ou de cæcum, en ayant soin d'opérer avec des filtrats aseptiques (ELLENBERGER). Ici encore les résultats ont été constamment négatifs.

Devant l'insuccès des expériences précédentes, c'est l'action des micro-organismes qu'il fallait mettre en évidence. L'hypothèse était d'autant plus logique que, d'une part, le nombre considérable d'Infusoires proliférant dans la panse incitait à leur attribuer un rôle, et que, d'autre part, les champignons, Actinomycètes et Bactéries étaient connus comme des agents de destruction de la cellulose dans le sol, les boues et les fumiers.

I. — ROLE DES CHAMPIGNONS ET ACTINOMYCÈTES

Un très grand nombre de travaux ont, depuis celui de DE BARY (1886), établi que divers Champignons et Actinomycètes étaient capables d'utiliser la cellulose comme source de carbone.

Mais la plupart de ces travaux se rapportent à des espèces prélevées sur les végétaux et dans le sol et étudient leur action dans ces conditions. Rares sont au contraire ceux qui étudient leur possibilité d'action dans le tube digestif des animaux et, en particulier, des Ruminants.

Du premier groupe de travaux nous ne retiendrons que les

conclusions générales sur le comportement de ces micro-organismes et sur les facteurs biologiques nécessaires à leur prolifération. Ces conclusions permettent de discuter leur rôle éventuel dans la digestion.

Les premières recherches en date sont celles de phytopathologistes qui étudient la pénétration de divers Champignons et Actinomycètes dans les végétaux. Il est difficile d'en tirer des conclusions précises (SCHELLENBERG), car il s'agit d'un matériel mal défini ; l'action proprement cellulolytique ne peut être discernée de celle sur les hémicelluloses.

Puis c'est surtout l'action des Champignons et Actinomycètes dans le sol qui fut étudiée. Nous citerons seulement les noms de KELLERMAN, Mc BETH, SCALES, WAKSMAN, DASZEWSKA, KRAINSKY, CONN, WINOGRADSKY. Du point de vue qui nous intéresse ces auteurs établirent d'abord quels sont les germes susceptibles d'utiliser la cellulose. Ils appartiennent surtout aux Champignons inférieurs, aux Ascomycètes, à certains Basidiomycètes, aux Actinomycètes. Mais, surtout, ces auteurs précisent quels sont les facteurs biologiques nécessaires à la prolifération des espèces étudiées.

WAKSMAN et SKINNER insistent sur le fait que les sols arides, bien aérés, pauvres en protides, leur sont particulièrement favorables. Dans les conditions inverses, ce sont les Bactéries qui l'emportent, en particulier les anaérobies. En anaérobiose les Champignons et Actinomycètes ne jouent aucun rôle dans la destruction de la cellulose ; cependant ils ne disparaissent pas complètement des sols. D'ailleurs un excès d'aération et d'acidité favorise davantage les Champignons que les Actinomycètes. De toute façon leur action est toujours lente.

Nous ne connaissons, par contre, que le travail d'ELLENBERGER et HOPFFE se rapportant au tube digestif des Ruminants. Ils isolent un champignon du genre *Aspergillus*, voisin de *Aspergillus niger*, qu'ils appellent *Aspergillus cellulosa* et dont ils étudient, *in vitro*, l'action sur la cellulose. Cet *Aspergillus* est trouvé dans le cæcum et le gros intestin du cheval, dans l'estomac et l'intestin de porc, dans la caillette des Ruminants et dans l'estomac de nombreux animaux domestiques. Il est isolé, *in vitro*, en milieu solide (agar mélangé à de la cellulose ou à du mannitol) et est cultivé en milieu liquide :

Eau	1.000 g.
Sulfate d'ammonium	2
PO ⁴ HK ³	1
SO ⁴ Mg.	0,5
NaCl	2

le carbone est ajouté sous forme de cellulose ou de mannitol ; les cultures sont faites à 37°. Les conditions de pH et de rH ne sont pas précisées. Cet *Aspergillus* est fixateur d'azote ; il peut en effet proliférer en milieu n'en contenant pas. Il peut vivre en symbiose avec d'autres germes trouvés dans le tube digestif des animaux : *Bac. mycoides*, *Bac. mesentericus*, *Bac. subtilis*, *megatherium*, *fluorescens*, etc.

ELLENBERGER a pu isoler une diastase soluble dans le liquide de fermentation ; en effet ce liquide, filtré sur bougie, stérile, attaque la cellulose. Le taux de cellulose détruite (en fermentation avec ferments figurés) atteint, dans certaines expériences, 59,09 p. 100. Les produits du métabolisme de cette fermentation semblent assez variables suivant les expériences : des corps réducteurs avant et après hydrolyse (inconstants), des corps donnant la réaction de MOLISCH, des corps jaunissant par les alcalis, de l'acide lactique, des corps donnant de l'iodoforme en présence de soude et d'iodure de potassium, des albumines solubles. Il ne donne ni gaz ni acides acycliques volatils. Les mêmes corps se formeraient quand l'*Aspergillus* vit en présence des bactéries de l'intestin ci-dessus énumérées.

L'auteur conclut que *Aspergillus cellulosa* joue un rôle important dans la digestion de la cellulose chez les animaux supérieurs et que des corps intermédiaires entre les acides acycliques et la cellulose doivent se former dans leur tube digestif et assurer leur nutrition.

Si nous rapprochons ces faits de ceux observés par les auteurs antérieurement cités et si nous essayons de conclure, il nous semble difficile d'admettre que les Champignons et les Actinomycètes soient aptes à jouer un rôle important dans le tube digestif des Ruminants.

Nous avons vu que la prolifération de ces micro-organismes demandait un milieu de réaction acide, pauvre en azote et surtout bien aéré, que, dans les conditions inverses, et surtout

en anaérobiose, les bactéries l'emportaient rapidement, qu'enfin leur action était toujours très lente. Or, le tractus digestif des Ruminants est essentiellement un milieu anaérobie, riche en azote et de réaction alcaline (sauf dans la caillette). Il semble, dans ces conditions, bien difficile que les Champignons et les Actinomycètes n'y soient pas rapidement supplantés par les Bactéries anaérobies.

L'*Aspergillus* isolé par ELLENBERGER l'a été en milieu alcalin et acide (intestin et estomac); les cultures ont été réalisées en aérobiose (cependant en présence de *Bac. subtilis*). La fréquence avec laquelle il est trouvé est un argument en faveur de son importance, mais il nous paraît difficile de dire s'il s'agit d'un germe jouant effectivement un rôle dans la digestion chez les Ruminants ou d'un germe, traversant le tractus digestif, après son ingestion avec le foin, sans y jouer un rôle important.

On retrouvera d'ailleurs la même difficulté à propos des nombreuses souches bactériennes isolées de la panse.

II. — RÔLE DES INFUSOIRES

Le problème du rôle éventuel des Infusoires de la panse dans la digestion de la cellulose est infiniment plus complexe.

La question a été posée pour la première fois par GRUBY et DELAFOND en 1843 au cours de leurs recherches sur la digestion chez les Ruminants. Depuis, la connaissance d'un certain nombre de faits a augmenté l'intérêt du problème : c'est tout d'abord le nombre réellement considérable des Infusoires de panse, un à deux millions, en moyenne, par centimètre cube (BECKER, SCHULZ, EMMERSON) et le volume non moins considérable qu'ils représentent, un douzième à un vingtième du contenu de la panse (FERBER-WINOGRADOWA FEDOROWA); c'est ensuite la découverte du rôle important joué, dans un cas analogue, par les Infusoires de l'intestin des Termites dans la digestion de la cellulose (CLEVELAND).

Mais la complexité du problème résulte surtout du fait que le rôle des Infusoires n'est pas univoque : il a toujours été difficile de séparer leur action sur la cellulose de celle qu'ils

pourraient avoir sur les protides, les pentosanes, les hémicelluloses, l'amidon et les graisses. Il a surtout été difficile de dissocier le rôle de leurs propriétés digestives du rôle qu'ils jouent par leur masse même (MANGOLD), puisqu'ils apportent chaque jour au Ruminant une ration supplémentaire de protide et de glycogène de l'ordre de 200 à 300 grammes (FERBER-WINOGRADOWA FEDOROWA).

Cependant, pour ne pas sortir du cadre de ce travail, nous nous bornerons à exposer ici les conclusions que l'on peut tirer du très grand nombre de travaux se rapportant à ce problème, conclusions concernant le pouvoir cellulolytique des Infusoires.

La question a été abordée par diverses voies ; des physiologistes, des chimistes, des protistologistes y ont coopéré.

TRAVAUX D'ORDRE PHYSIOLOGIQUE. — Ils sont de deux ordres et ne nous apportent que peu de renseignements sur le point précis qui nous intéresse.

Un certain nombre d'auteurs ont tout d'abord cherché à « défauner » (1) les Ruminants et à comparer leur croissance avec celle d'animaux normaux, témoins, recevant la même ration alimentaire, surtout à base de cellulose.

Les techniques de défaunation sont nombreuses (DOGIEL, BECKER, HSIUNG...). Les plus simples consistent à faire jeûner l'animal, ou bien à le mettre à l'alimentation lactée en y ajoutant ou non un antiseptique (sulfate de cuivre, surtout). L'animal est maintenu défauné pendant le cours de l'expérience en prenant toutes précautions pour éviter le contact, direct ou indirect, avec les animaux témoins. Il est important (BECKER) de ne pas modifier en même temps la flore bactérienne de la panse ; or, c'est ce qui se passe lorsqu'on fait usage d'antiseptiques. Il est nécessaire, dans ce cas de réensemencer la panse en Bactéries, après défaunation, au moyen de liquide de panse privé de ses Infusoires par refroidissement, mais conservant sa flore bactérienne.

Avec ces techniques BECKER et EVERETT (sur sept moutons défaunés et sept moutons témoins) n'ont pu mettre en évidence de différences de croissance.

(1) Traduction littérale du mot, couramment employé en langue anglaise « defaunation » et dont nous n'avons pas trouvé d'équivalent français.

Les auteurs d'un second groupe de travaux analysent davantage le problème et cherchent à mettre en évidence une corrélation entre la prolifération, le nombre des Infusoires et le type d'alimentation fournie au Ruminant (FERBER, MOWRY et BECKER). Ces derniers auteurs, dans une expérience portant sur deux chèvres recevant une alimentation riche en cellulose et pauvre en autres éléments (foin desséché), ont vu le nombre des Infusoires baisser de 300.000 à 250.000 par centimètre cube pour les *Entodinium* et de 10.000 à 7.000 pour les *Diplo-*
dinium.

De cette première série de travaux d'ordre physiologique il semblerait que l'on puisse conclure que la digestion de la cellulose par les Infusoires de la panse est nulle ou tout au moins négligeable.

TRAVAUX D'ORDRE CHIMIQUE. — Ils se proposent d'établir un bilan comparé de la digestion chez les Ruminants normaux et chez les défaunés.

La technique réalisée est la suivante (BECKER, SCHULZ et EMMERSON) : quatre chèvres normales sont nourries pendant une première période avec une ration alimentaire où sont titrés : les protides, l'extrait éthéré, la cellulose brute, la cellulose pure, les hémicelluloses, les pentosanes ; en même temps les mêmes analyses sont faites dans les excréta. Dans une deuxième période, les animaux, après avoir été défaunés, sont soumis aux mêmes expériences. Pour une des chèvres seulement les coefficients de digestibilité étaient ainsi modifiés en faveur de la période avec Infusoires :

Cellulose brute	+ 5 p. 100
Cellulose propement dite . .	+ 6 p. 100
Pentosanes	+ 2 p. 100
Hémicellulose	+ 5 p. 100

Pour les trois autres chèvres les différences étaient nulles ou même faiblement inversées.

Les seules conclusions que nous puissions tirer sont donc que, même si la dégradation de la cellulose est plus parfaite chez les animaux normalement faunés, le gain est extrêmement faible, et pour ainsi dire négligeable.

TRAVAUX D'ORDRE PROTISTOLOGIQUE. — Ce sont les plus nombreux. Deux voies tout à fait différentes ont été suivies. Certains auteurs se sont attachés à suivre les transformations éventuelles de la cellulose dans les cavités digestives des Infusoires (transformations d'ordre morphologique et chimique); d'autres ont cherché à réaliser *in vitro* la digestion de la cellulose par les Infusoires, c'est-à-dire des cultures de ceux-ci.

A) **Transformation de la cellulose dans les cavités digestives des Infusoires.** — SCHUBERG, le premier (1888) constate la présence de très volumineuses particules de cellulose dans les cavités digestives d'*Entodinium* et de *Diplodinium* et attribue à ceux-ci le pouvoir de la digérer. CERTES (1889) observe les mêmes faits et, de plus, la présence de réserves de glycogène dans l'endoplasme. EBERLEIN (1895) assiste à la désintégration de fragments de cellulose dans le sac endoplasmique des Ophrioscolécidés. LIEBETANZ (1910) et BRAUNE confirment ces faits.

REICHENOW (1927), affirme que, à côté des Bactéries, les Infusoires doivent jouer un rôle dans la digestion de la cellulose; il se base surtout sur les analogies avec la symbiose « Termite-Infusoires-Bactéries » décrite par CLEVELAND. Ce dernier, lui-même, en 1924, pense que les Infusoires tels que *Diplonidium*, *Entodinium*, *Butschlia*, *Ophryoscler*, d'une manière générale tous les Ophryoscolécidés, digèrent la cellulose au même titre que les Bactéries. Il attribue la même propriété aux Isotrichidés (*Isotricha*, *Dasytricha*) bien que l'on n'ait pu mettre de cellulose en évidence dans les vacuoles digestives de ces derniers.

D'ailleurs TRIER (1926) défend également la théorie de la symbiose des Infusoires et des Bactéries de la panse.

L'opinion était cependant loin d'être unanime et toute une série d'auteurs refusent de reconnaître aux Infusoires la propriété de digérer la cellulose (BUNDEL, 1895; BIEDERMAN, 1911; SCHEUNERT, 1924; SCHEUNERT et SCHIEBLICH, 1927; USUELLI, 1930).

Le point essentiel pour trancher la question était, en somme de suivre de façon précise la désintégration de la cellulose dans les cavités digestives et le protoplasme des Infusoires.

Le phénomène avait été vu approximativement par EBERLEIN,

SCHULZE, TRIER; il avait été nié par DOGIEL et FEDOROWA. Récemment WEINECK E. (1934), dans toute une série d'expériences d'ordre microchimique, a définitivement établi que les Infusoires de la panse digèrent l'amidon et la cellulose et les transforment en glucose qui est en partie utilisé, en partie mis en réserve sous la forme de glycogène et de paraglycogène.

WEINECK opère sur des Infusoires fixés dans le formol à 4 p. 100, prélevés à divers stades de leur développement. Au moyen de réaction colorée (Technique de MOLISCH, 1918; DISCHE et POPPER) il assiste à la transformation de la cellulose en cellobiose et en glucose suivant un processus analogue à celui de la digestion diastasique de la cellulose. Il n'a pu isoler de diastase; celle-ci, cependant, indubitable, agit en milieu faiblement acide au niveau de la partie haute de l'endoplasme.

C'est dans l'endoplasme également que le glucose non utilisé est transformé en glycogène: il passe ensuite dans l'ectoplasme, se transforme en paraglycogène et se loge dans les rayons des lames squelettiques (formées de cellulose de réserve). Il est utilisé par l'Infusoire au moment des phénomènes de division.

On peut donc considérer comme certain le fait que les Infusoires, au même titre que les Bactéries, sont susceptibles d'attaquer la cellulose; mais, pour les Infusoires, un stade intermédiaire est particulièrement intéressant, celui du glucose et de son dérivé le glycogène.

B) *Essais de digestion in vitro de la cellulose par les Infusoires*. — Nous serons beaucoup plus bref sur ce point. Les travaux sont beaucoup moins nombreux et, l'on peut dire, presque tous négatifs. Nous avons fait nous-même quelques essais qui seront exposés à la deuxième partie de ce travail; ils n'apportent aucun renseignement positif.

Nous ne ferons que citer les essais de COSTE, 1864; EDWARDS, 1864; POUCHET, 1864; SCHUBERG, 1888; CERTES, 1889; GÜNTHER, 1899; FIEBIGER, 1923; BECKER et TALBOT, 1927; WINOGRADOWA, 1929. En 1928 KNOTH obtint une survie de 107 heures en cultivant les Infusoires dans un milieu où l'élément nutritif était de la cellulose sous forme de foin, où le pH était maintenu à 6,8 par de la magnésie; la culture était faite dans des flacons où

l'air était remplacé par un mélange de gaz carbonique et de méthane.

En 1930, MARGOLIN réussit à conserver, pendant plusieurs semaines, les Infusoires dans un milieu complexe; c'est essentiellement une cellulose, en fermentation bactérienne impure, réensemencée secondairement avec du liquide de panse contenant des Infusoires. Mais MARGOLIN ne semble pas avoir poursuivi ses recherches et les essais de nombreux auteurs, faits ultérieurement, pour reproduire ces expériences ont été négatifs.

En tout cas il serait difficile de tirer des conclusions précises de cet ensemble de travaux : la complexité des milieux utilisés (cellulose, produits d'hydrolyse de la cellulose par les bactéries, bouillon de foin, peptone..., etc...) ne permettent pas de déterminer une action élective sur la cellulose.

Si, de l'ensemble de ce chapitre, on cherche à tirer des conclusions il semble que l'on puisse dire : les Infusoires de la panse sont capables de digérer la cellulose ; ils la transforment en glucose et en glycogène ; ils ne jouent aucun rôle dans la digestion de la cellulose chez les Ruminants ; ils ne jouent qu'un rôle indirect par l'apport de glycogène (et accessoirement de protides) qu'introduisent leurs cadavres dans la caillette ; cet apport supplémentaire est négligeable pour le Ruminant.

II. — RÔLE DES BACTÉRIES

Si le rôle que jouent, dans la digestion de la cellulose, les Champignons, les Actinomycètes et les Infusoires, était resté et reste discuté, il n'en est pas de même de celui des Bactéries. Depuis TAPPEINER, en 1881, nombreux sont les auteurs qui ont démontré, *in vitro*, la réalité de la digestion de la cellulose par les Bactéries du tube digestif des Ruminants. Mais les modalités même de cette fermentation sont loin d'être précisées. En effet, si la digestion de la cellulose au moyen de la flore totale de la panse avait pu être réalisée, la plupart des essais, pour isoler en culture pure un germe cellulolytique, avaient été vains.

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer ce fait : ou bien la fermentation ne peut être réalisée que par une symbiose de germes ; ou bien les milieux utilisés sont impropres à la culture des germes recherchés.

Le problème s'est trouvé compliqué du fait que certains auteurs ont isolé de la panse, des bactéries aérobies, anaérobies et thermophiles faisant partie de la flore cellulolytique classique du sol. Jusqu'à quel point fallait-il leur attribuer un rôle dans la digestion de la cellulose *in vivo*? Autre chose est d'isoler, dans un milieu artificiel, un germe qui se montre cellulolytique ; autre chose de démontrer son rôle *in vivo* dans des conditions toutes différentes.

Nous grouperons les travaux se rapportant à ce problème sous un double chef : Dans une première partie seront signalés ceux qui se rapportent directement à des essais de cellulolyse, à partir de la flore de la panse, soit en cultures impures, soit en cultures pures.

Dans une deuxième partie, considérant l'ensemble de la flore cellulolytique du sol, nous essayerons de voir quels sont, de par leurs caractères biologiques, les groupes bactériens susceptibles de jouer un rôle dans la panse.

Il nous faudra ensuite voir quelles peuvent être les interactions de ces microorganismes entre eux, interractions d'origine biologique ou chimique.

A) Essais de cellulolyse à partir de la flore bactérienne de la panse. — Le premier travail en date est celui de TAPPEINER (1881) ; cet auteur n'a pas cherché à obtenir des espèces pures mais il a démontré le pouvoir cellulolytique de l'ensemble de la flore de la panse ; il se sert d'un milieu nutritif complexe contenant de l'extrait de viande Liebig. La cellulose est fournie sous forme de papier-filtre ou de coton. Il ensemence avec le contenu du rumen (également avec le côlon et le cæcum du bœuf et du cheval) et observe la cellulolyse après 5 ou 6 jours à l'étuve à 37°. Il se forme des acides acycliques (butyrique et acétique) et des gaz (hydrogène, gaz carbonique et méthane). TAPPEINER observe sur les fibres en voie de cellulolyse la présence de nombreuses bactéries, la plupart à spore terminale.

En 1903, ANKERSCHMIT, utilisant une technique analogue,

démontre également le pouvoir cellulolytique de la flore du rumen. Il utilise un milieu artificiel, uniquement minéral, où l'azote est fourni sous forme de sulfate d'ammonium (milieu utilisé par OMÉLIANSKY et WINOGRADSKY pour la culture des cellulolytiques du sol). Mais les cultures perdent leur pouvoir cellulolytique lors des essais d'isolement.

HÖSSLIN et LESSER (1910), dont nous signalons les travaux, bien qu'ils se rapportent à la flore du cæcum du cheval (le problème est le même) prélèvent le contenu du cæcum, le filtrent, et le stérilisent après adjonction, dans certains cas, de peptone de WITTE. Ils ensemencent ensuite avec le contenu du cæcum. La cellulolyse se produit dans 5 cas sur 15. Ils observent en outre que l'adjonction de glucose retarde, ou empêche, l'attaque de la cellulose.

CHOUKEVITCH, en 1911, utilise le milieu d'OMÉLIANSKY ou de l'eau physiologique contenant un fragment de pomme de terre. Il obtient la cellulolyse et remarque, dans les cultures, des bacilles à spore terminale (*B. gazogenes* et des germes du groupe des *B. Rodella III*) analogues à ceux d'OMÉLIANSKY et non cellulolytiques en culture pure. Dans ces fermentations complexes il se forme même un peu d'hydrogène sulfuré. Il isole également des germes qui fermentent les héli-celluloses (*B. gazogenes parvus*). Les mêmes résultats sont obtenus à partir du gros intestin du bœuf et du mouton.

A. HOPFFE en 1919 essaye toute une série de milieux. Les uns sont organiques, constitués par du liquide de panse étendu d'eau physiologique et amené à un pH légèrement alcalin, ou bien par des solutions salines diverses auxquelles sont ajoutées de l'asparagine, de la peptone, de l'extrait LIEBIG ou du glucose. Les autres sont inorganiques : solutions salines du type de celles d'OMÉLIANSKY. La cellulose est adjointe sous forme de papier-filtre. Dans tous ces milieux, l'ensemencement, avec le contenu de la panse, entraîne la cellulolyse, dans un délai variant de 8 jours à 3 semaines ; mais les repiquages en série continue ne sont pas possible, les cultures perdant rapidement leur pouvoir cellulolytique. Les isolements en culture pure ne donnent pas de résultats.

Y. KHOUVINE isole, en 1923, dans les matières fécales de l'homme, un germe qu'elle retrouve ensuite dans l'intestin des

Ruminants, du cheval, du cobaye, du lapin et dans le sol. *Bac. cellulosaë dissolvens*, à spore terminale, anaérobie strict, est le premier, isolé du tube digestif, qui se soit maintenu cellulolytique en culture pure. Il ne peut utiliser que la cellulose comme source de carbone. Le milieu de choix pour le cultiver est un milieu salin auquel est ajouté de l'extrait fécal. C'est l'emploi de ce milieu, où l'azote est fourni sous une forme complexe et au degré de dégradation voulu, qui a permis la culture pure. Les produits connus du métabolisme de la fermentation sont des acides acycliques volatils, de l'alcool éthylique, un pigment jaune, du gaz carbonique et de l'hydrogène. Le carbone de ces divers corps représente environ 50 p. 100 de celui de la cellulose disparue. Il n'a pas été possible de mettre en évidence la formation de corps intermédiaires de dégradation.

CH. ARNAUDI, en 1931, ensemence avec du contenu de la panse et de l'intestin des Ruminants des plaques au silico-gel préparées suivant la technique de WINOGRADSKY. Il y met ainsi en évidence des aérobies des genres *Sp. cytophaga* et *Cellvibrio*. La répartition le long du tube digestif est irrégulière : germes surtout abondants dans la panse, en très petite quantité dans le feuillet, le bonnet et le cæcum, absents dans la caillette.

Enfin WOODMAN et STEWART, dans une observation non publiée mais signalée dans un autre travail, isolent de la panse de mouton une bactérie thermophile qui fait fermenter la cellulose, en milieu inorganique, à 65°, mais est sans action à 37°.

De tous ces travaux il résulte que l'ensemble de la flore de la panse est cellulolytique *in vitro* ; que l'on a pu isoler un germe aérobie et un germe thermophile qui ont gardé leur pouvoir cellulolytique en culture pure. Mais nous dirons que les conditions de l'isolement donnent à ces essais des valeurs très différentes.

B) *Rôle éventuel des divers groupes de B. cellulolytiques du sol.* — Il est de toute nécessité d'envisager le problème de ce point de vue car il est évident que les Ruminants ingèrent, avec leur alimentation, tous les germes du sol ; de fait nous venons de voir qu'ont été isolés, de leur tube digestif, des aérobies, des anaérobies et des thermophiles. Nous étudierons ces groupes du double point de vue des facteurs biologiques

nécessaires à leur culture et du métabolisme de la fermentation qu'ils provoquent.

a) AÉROBIES. — C'est dans ce groupe, sans aucun doute, qu'ont été isolées le plus grand nombre d'espèces depuis que VAN ITTERSON, en 1904, a décrit *Bac. ferrugineus*.

Puis de 1912 à 1924, KELLERMAN et ses collaborateurs, Mc BETH, SCALES, SMITH, isolent une trentaine d'espèces du groupe *Cellulomonas*. Les cultures se font sur gélose contenant de la cellulose précipitée. Nous ne ferons que signaler les polémiques entre KELLERMAN et LÖHNIS, d'une part, OMELIANSKY et PRINGSHEIM, d'autre part, sur la fonction cellulolytique ainsi mise en évidence. Le fait est que, si le taux de cellulolyse est relativement faible (14 p. 100 environ) il n'en n'est pas moins indubitable.

D'ailleurs en 1919 HUTCHINSON et CLAYTON décrivent une espèce *Spirochæta cytophaga* (dont ils font une analyse très poussée), reprise ensuite par WINOGRADSKY, et dont le pouvoir cellulolytique est bien établi. Un certain nombre d'auteurs confirment le fait pour d'autres espèces — BRADLEY et RETTGER, SKINNER, LÖHNIS et LOCHHEAD, BOJANOWSKY. — WAKSMAN et SKINNER, en 1924, en particulier, démontrent par des mesures chimiques directes que *B. fimi* de KELLERMAN, mis dans des conditions favorables, détruit, à un taux assez élevé, la cellulose dans le sol et les milieux de culture.

Cependant le fait semble encore à démontrer pour *Vibrio agar liquefaciens* isolé en 1924 par GRAY et CHALMERS et pour la bactérie isolée par SACK en 1924 (WAKSMAN et SKINNER).

Dans toute une série de travaux WINOGRADSKY isole, sur plaques au silico-gel, à côté du genre *Cytophaga*, des germes des genres *Cellvibrio* et *Cellfalcicula*, différenciables surtout par la coloration des pigments qu'ils forment.

GRÖENEWEGE isole en 1920 *B. cellare-solvens*, qui n'est cellulolytique qu'associé à des bactéries dénitrifiantes ; SIMOLA, en 1931, décrit deux espèces à sporulation clostridiforme *B. myxogenes* et *B. mucosus*.

Quels sont, c'est surtout ce qui nous intéresse, les facteurs biologiques nécessaires à la prolifération de ces germes ?

Tout d'abord une large aération du milieu (les plaques au

silico-gel sont surtout utilisées) et, dans les conditions naturelles un sol bien aéré. Dans les conditions naturelles, également, le sol doit être de réaction neutre ou alcaline, sinon ce sont les champignons qui l'emportent (WASKMAN et STARKEY, 1924). Dès que l'aération diminue (sol imprégné d'eau) ce sont les bactéries anaérobies qui dominent (WAKSMAN et SKINNER, 1926). Les besoins en azote sont faibles (nitrates, sels ammoniacaux, amides, acides aminés en faible quantité). Parmi ces germes, les uns ne peuvent utiliser que la cellulose comme source de carbone (*Sp. cytophaga*), les autres peuvent fermenter un grand nombre de glucides (*Cellulomonas*, *B. myxogenes*, *B. mucosus*, etc.).

Quant aux corps formés au cours de la fermentation, ils ont surtout été étudiés par WINOGRADSKY : le phénomène essentiel est une oxydation qui aboutit à la formation d'oxy-cellulose. Celle-ci est soluble dans les alcalis et est précipitée par les acides. Elle ne réduit pas la liqueur cupro-potassique, sauf, rarement d'ailleurs, après hydrolyse par les acides forts. Il ne se forme jamais d'acides acycliques ni de gaz et, ajoute WINOGRADSKY, « la seule présence de ces corps est à envisager comme l'indice de l'ingérence des anaérobies ».

Si l'on résume donc les caractères biochimiques des aérobies, on peut retenir essentiellement : milieu largement aéré et de réaction alcaline ; azote fourni surtout sous forme ammoniacale et nitrique ; germes transformant la cellulose en oxy-cellulose sans qu'il y ait jamais formation d'acides acycliques ni de gaz.

b) THERMOPHILES. — Nous rappelons que ces germes, très communs dans les fumiers, ont été trouvés dans la panse (WOODMAN). Le nombre de souches isolées en est relativement restreint depuis la première étude qui en a été faite par MAC FAYDEN et BLAXALL, en 1890, sur une culture contenant, au moins, deux germes associés. D'ailleurs la pureté de la plupart des souches utilisées a été contestée par beaucoup d'auteurs (TÉTRAULT-KHOUVINE). TÉTRAULT est le premier (1930) qui ait pu isoler une souche en milieu solide et garder son pouvoir cellulolytique par repiquage d'une colonie unique en milieu liquide. Le même résultat a été obtenu, avec une technique différente par SNIESZKO (1933).

Nous ne retiendrons des thermophiles, comme au chapitre précédent, que ce qui est en rapport avec leurs propriétés biologiques.

Le fait essentiel est leur température de culture dont l'optimum varie de 60° à 70°. Le germe isolé par WERKMAN et STRITAR est cultivé, cependant, à l'optimum de 56°. Il est important de noter qu'il n'y a pas toujours coïncidence entre des limites thermiques de culture et les limites thermiques de cellulolyse. Ainsi *Clostridium thermocellum* isolé par VIEJOEN, FRED et PETERSON, peut être cultivé entre 38° et 72° ; il n'est cellulolytique qu'entre 43° et 65°.

Les réactions des thermophiles vis-à-vis de l'oxygène sont très variables. Toutes sont plutôt anaérobies ; une seule est franchement aérobie : *Bac. thermocellolyticus* (COOLHAS) ; encore ce dernier, cultivé sur milieu solide, cesse-t-il d'être cellulolytique en milieu liquide. Mais toute la gamme de tolérance à l'oxygène peut être mise en évidence sur un même germe. Les produits du métabolisme de la fermentation sont alors profondément modifiés (LANGWELL, 1926 ; LYMN et LANGWELL, 1923). Avec une aération restreinte, il se forme surtout des acides acycliques (acétique). Avec une aération assez vive, au contraire, c'est l'alcool éthylique qui domine.

Les limites de pH sont extrêmement variables. La souche isolée par SARLES, FRED et PETERSON peut être cultivée entre pH = 6,6 et pH = 6,8 ; celle de WERKMAN et STRITAR, entre pH = 5,4 et pH = 9. Ici encore on note, en rapport avec le pH, des variations du métabolisme. Ces derniers auteurs signalent :

pH = 9	0,57	p. 100 d'acide formique
pH = 7,2	0,14	— —
pH = 5,4	0	— —

Enfin les Bactéries thermophiles sont assez exigeantes en azote ; dans la nature ce sont essentiellement des bactéries des fumiers, riches en azote aminé et ammoniacal. *In vitro*, les milieux de culture qui leur sont les plus favorables contiennent 5 p. 100 de peptone (SARLES, FRED et PETERSON). Elles ne sont pas, d'ailleurs, exclusivement cellulolytiques et elles peuvent utiliser le carbone de presque tous les glucides : sucres divers, amidon, hémicellulose (LYMN et LANGWELL).

Quant aux produits de fermentation ils sont extrêmement variés. Ce sont essentiellement des acides acycliques volatils ou stables, des gaz, de l'alcool éthylique. LYMN et LANGWELL ont trouvé les proportions suivantes :

Acide acétique . .	20 à 80 p. 100		
Acide butyrique . .	0 à 30 —	(manque dans 9/10 ^e des cas)	
Acide lactique . .	0 à 60 —	(— 6/10 ^e —)	
Alcool éthylique . .	0 à 30 —	(— 2/10 ^e —)	
Gaz carbonique . .	0 à 49 —	(— 5/10 ^e —)	

MAC FAYDEN et BLAXAL signalent en outre la présence de méthane et d'hydrogène. PRINGSHEIM, WERKMAN et STRITAR, celle d'acide formique. On voit donc la très grande diversité des corps qui peuvent se former au cours de la fermentation suivant les conditions de l'expérience.

Bien plus, et c'est là un fait important à retenir, certains auteurs ont pu mettre en évidence des sucres réducteurs dans les cultures, sans aucun artifice.

TÉTRAULT (1930), SCOTT, FRED et PETERSON (1930) trouvent du glucose en fin de fermentation. Le phénomène est surtout étudié par SARLES, FRED et PETERSON (1930). Ils opèrent en culture pure et remarquent qu'au cours d'une série d'ensemencements successifs (à 48 heures d'intervalle) sur boîte de PETRI à cellulose-agar, le pouvoir de produire des acides acycliques, lorsqu'on repique en milieu liquide, augmente ; puis il passe par un maximum et baisse. Le même phénomène est observé pour la production de glucose, en milieu liquide. Mais les deux maxima ne coïncident pas : L'optimum de la formation du sucre est en retard d'un repiquage (sur plaque) sur celui de la production d'acides acycliques. Ces optima sont de :

Acides acycliques exprimés en acide acétique :			
	59,9 p. 100	de la cellulose	origine
	72,2 —	—	décomposée.
Sucres réducteurs exprimés en glucose :			
	19,6 p. 100	de la cellulose	origine
	27 —	—	décomposée.

Si nous résumons donc les caractères qui peuvent nous intéresser au sujet des B. thermophiles, on peut noter :

Germes cellulolytiques à 60°, environ, pouvant proliférer (sans être cellulolytiques) dans des limites thermiques plus

larges, en particulier à 37°; germes tolérant de larges variations de pH et de rH, exigeant de l'azote en assez grande quantité (ammoniacal et, surtout, aminé), donnant, au cours de la cellulolyse des acides acycliques, des gaz, de l'alcool et, dans certaines conditions, des sucres réducteurs.

c) ANAÉROBIES. — Les germes cellulolytiques anaérobies ont été les premiers étudiés et connus. Cependant nous serons très bref à leur sujet car le nombre des espèces isolées du sol est relativement faible en raison de la difficulté de leur culture *in vitro*. D'autre part les quelques souches isolées ne diffèrent entre elles que par des points de détail. Qu'il s'agisse de *B. fossicularum* ou *methanigenes* d'OMELIANSKY (B. de la fermentation hydrogénée et B. de la fermentation méthanique), isolés primitivement dans les limons de la Néva, et retrouvés souvent depuis, qu'il s'agisse de *Clostridium cellulosolvens* de COWLES et RETTGER, de *Bac. cellulosa fermentans* de WERNER (dans l'intestin des larves de *Potosia cuprea*), leurs caractères en sont assez constants : bactéries à spore terminale, strictes au point de vue du pH (neutre ou légèrement alcalin), strictes également au point de vue du rH, mais à des degrés divers. KHOUVINE signale que dans les cultures impures la seule présence d'aérobies suffit pour priver le milieu d'oxygène : SNIESKO précise qu'il suffit que le bleu de méthylène soit réduit au fond du tube de culture. La plupart des bactéries n'utilisent, comme source de carbone, que la cellulose ; ils n'ont que des besoins restreints en azote (azote ammoniacal dans les milieux type OMELIANSKY, WINOGRADSKY).

Ces caractères leur permettent de proliférer sans aucune concurrence dans les sols mal aérés, imprégnés d'eau, toutes conditions incompatibles avec l'action des aérobies, des champignons et des actinomycètes.

Les produits du métabolisme de la fermentation sont également à peu près constants : acides acycliques volatils (acétique et butyrique), alcool éthylique, hydrogène, gaz carbonique et méthane. Nous ne discuterons pas ici du degré de pureté des souches en rapport avec la nature des gaz isolés. En particulier la présence simultanée d'hydrogène et de méthane traduirait une culture impure (SNIESZKO, CLAUSEN, KHOUVINE, etc.).

C) **Interréactions bactériennes.** — Qu'ils vivent dans le sol ou dans la panse, tous les microorganismes qui viennent d'être étudiés sont en rapport les uns avec les autres (dans la limite où ils peuvent proliférer simultanément) et avec des bactéries saprophytes. Il se crée une sorte d'équilibre à chaque moment, en rapport avec les conditions actuelles du milieu. Les interréactions de ces germes ont été très discutées, car on avait été frappé du fait que les cultures impures étaient cellulolytiques à des taux très élevés, tandis que les cultures pures l'étaient à un taux bien moindre, ou, même, ne l'étaient plus du tout.

Ces faits ont été, d'une manière générale, interprétés de deux façons différentes : ou bien il s'agit d'une symbiose véritable, ou bien les saprophytes agissent en modifiant le milieu de culture, surtout en dégradant plus ou moins les protides, et permettent ainsi la prolifération des cellulolytiques dont les besoins en azote sont bien définis.

Nous laisserons complètement de côté le problème de la limitation des actions bactériennes dans le sol, en rapport avec l'azote disponible (phénomène de balancement des cellulolytiques et des fixateurs d'azote), problème qui n'intéresse strictement que la bactériologie du sol mais qui est cependant un très bel exemple des faits d'équilibre dont nous parlions plus haut (Il serait du plus haut intérêt d'étudier ces phénomènes d'équilibre dans la panse, milieu remarquablement constant, à variations saisonnières seulement).

Nous ne nous occuperons ici que des faits de symbiose bactérienne éventuelle dans la fermentation de la cellulose.

Un certain nombre d'auteurs, en effet, ANKERSCHMIT, CHOUKEVITCH, HÖSSLIN et LESSER, HOPFFE, devant l'impossibilité d'isoler de la panse une bactérie qui soit cellulolytique en culture pure, pensent qu'une symbiose est nécessaire. C'est également l'opinion de BECKWITH et ROSE qui se heurtent aux mêmes difficultés pour isoler des bactéries cellulolytiques de l'intestin des Termites. Cependant HOPFFE émet l'hypothèse que les milieux utilisés ne sont pas favorables et essaie, sans succès d'ailleurs, le simple contenu de panse dilué. MAC FAYDEN et BLAXAL pensent également qu'une symbiose est nécessaire pour obtenir la cellulolyse avec les thermophiles.

SANBORN, dans toute une série de travaux sur les aérobies,

insiste sur l'importance de ces symbioses, au sens vrai du mot, et sur l'existence de facteurs non identifiés et détruits par la chaleur. Il montre que la cellulose (feuille morte) stérilisée par l'alcool à 60° est plus facilement fermentée que celle stérilisée à l'autoclave.

COWLES (1930), COWLES et BETTGER (1931), isolant des souches analogues à celles d'OMÉLIANSKY, anaérobies strictes, constatent la perte complète de leur pouvoir cellulolytique en culture pure ; au contraire, la cellulolyse se produit par association avec *B. ærogenes* avec *Bact. coli* ou avec *Proteus vulgaris*. Ils discutent les deux hypothèses émises ci-dessus.

SNIESZKO peut obtenir une culture cellulolytique à partir d'un seul germe thermophile en ensemençant en même temps son milieu avec *Sterigmatocystis nigra*.

COOHLAS pense que la fermentation anaérobie de la cellulose est le fait d'une association d'aérobies et d'anaérobies ; les premiers attaquent la cellulose, les seconds forment des gaz.

CLAUSEN, reprenant l'étude des bacilles d'OMÉLIANSKY, démontre que *B. fossicularum*, à l'état de pureté, est fort peu cellulolytique ; au contraire, associé à *B. putrificus* ZEISSLER, il donne une fermentation analogue à la fermentation brute. Le même résultat est obtenu en cultivant *B. fossicularum* sur bouillon, préalablementensemencé avec *B. putrificus*, puis filtré.

Cette dernière expérience semble l'expérience cruciale. Les associations de germes n'agiraient-elles qu'en modifiant le milieu de culture ? C'est l'opinion de toute une série d'auteurs.

SKINNER (1930), reprenant les travaux de SANBORN, fait remarquer que cet auteur se base sur la baisse plus ou moins rapide du pH dans le milieu pour juger de la valeur des associations. Il constate que les cultures mixtes *Sp. cytophaga* et *Azotobacter achroococcum* voient leur pH baisser plus rapidement en présence de sulfate d'ammonium qu'en présence de nitrate de potasse. C'est qu'en effet *Az. achroococcum*, en présence d'acides acycliques, utilise l'azote inorganique ; le milieu devient donc plus acide dans le premier cas (disparition du radical alcalin) que dans le second (disparition du radical acide). De plus, *Az. achroococcum* n'a aucune influence sur la culture cellulolytique de *T. Kæninge* qui ne forme justement

pas d'acides acycliques. D'ailleurs, *Az. achroococcum* ne modifie jamais le taux de la cellulolyse.

Enfin le travail de Y. KHOUVINE tranche définitivement la question en ce qui concerne le tube digestif de l'homme. *B. cellulosa dissolvens* a pu être isolé en culture pure et rester cellulolytique, cela, justement grâce à l'usage d'un milieu spécial, caractérisé par la présence d'une source d'azote protéique dégradé sous forme d'extrait fécal.

Les expériences personnelles que nous apportons à la deuxième partie de ce travail permettent de donner les mêmes conclusions en ce qui concerne la panse des Ruminants.

CONCLUSIONS

Si nous cherchons à résumer les faits qui peuvent être considérés comme acquis au sujet de la digestion de la cellulose dans la panse, il est possible d'affirmer que les Ruminants digèrent la cellulose mais que ni les sucs digestifs qu'ils sécrètent ni les cellulases contenues dans les végétaux, ne peuvent expliquer le mécanisme de cette digestion. On peut également affirmer que ce sont les microorganismes de la panse qui en sont responsables, que, parmi ceux-ci, les Champignons, les Actinomycètes, les Bactéries aérobies et thermophiles sont dans des conditions très défavorables pour proliférer et agir activement, que les Infusoires n'apportent au Ruminant qu'une ration supplémentaire et négligeable de glucose, de glycogène et de protides, que seules les Bactéries anaérobies, de par les conditions biologiques du milieu, semblent aptes à mener à bien la décomposition de la cellulose.

CHAPITRE III

MÉCANISME DE LA NUTRITION

Le problème qui se pose maintenant est de savoir sous quelle forme la cellulose est assimilée ; quels peuvent être les termes intermédiaires ou terminaux de dégradation susceptibles d'être utilisés par les Ruminants comme source d'énergie.

I. — VALEUR ÉNERGÉTIQUE DE LA CELLULOSE

Le fait de base sur lequel il faudra s'appuyer et qu'il faut expliquer est la parfaite utilisation de la cellulose comme source énergétique. Le fait a été démontré par KELLNER et KOHLER (1900) et KELLNER (1905).

Nous ne retiendrons pas les travaux antérieurs de HENNEBERG et STOHRMAN (1859), PAPPEINER (1881-1888) et d'autres, qui nient ou affirment alternativement la valeur nutritive de la cellulose.

Le principe utilisé par KELLNER est le suivant : il cherche à établir pour une ration donnée, la valeur totale des échanges (excréta gazeux, liquides et solides) pour un animal au repos. Il lui est ainsi possible de comparer la valeur énergétique de diverses rations. Voici la technique qu'il emploie : il se sert de chambres respiratoires, suffisamment grandes pour contenir un bœuf, closes, avec des soupapes pour l'admission et pour la sortie de l'air. Celui-ci est introduit régulièrement, à un taux mesuré, et on y dose à intervalle régulier le gaz carbonique, le méthane et la vapeur d'eau. L'animal est de plus muni d'un appareil qui permet de recueillir séparément les urines et les fèces. Il est ainsi possible de mesurer chaque jour les excréta

solides, liquides et gazeux. De plus l'animal est régulièrement pesé.

Il détermine d'abord la ration nécessaire pour maintenir constant le poids de l'animal. Puis il ajoute diverses substances à la ration d'entretien ainsi déterminée et étudie la variation des échanges qu'il compare à ceux provoqués par l'amidon pris comme base (équivalent d'amidon). Ou bien il compare les valeurs énergétiques par les variations de poids, les échanges restant constants. Ces deux méthodes lui donnent les mêmes résultats.

La valeur énergétique de la cellulose est la même que celle de l'amidon, supérieure à celle du saccharose et du glucose. Il s'agit, bien entendu de cellulose pure, si l'on utilise des celluloses incrustées le rendement baisse d'autant.

Il s'agit donc d'expliquer ce fait et de voir par quelle transformation la cellulose peut être assimilée sous une forme énergétique. En effet, si la transformation de l'amidon, sous l'influence de l'amylase, en maltose, et de ce dernier, sous l'influence de la maltase, en glucose, explique parfaitement sa valeur énergétique, il n'en est pas de même pour la cellulose. Les phénomènes d'hydrolyse chimique aboutissent bien au glucose par l'intermédiaire de divers polyoses, mais les fermentations bactériennes anaérobies, les seules qui nous intéressent, ne donnent rien de tel ; nous les avons vues former des gaz, des acides acycliques volatils, de l'alcool éthylique. Un thermophile cependant donnait un sucre réducteur en fin de fermentation à 60°.

Le premier problème qui se pose est donc de savoir si l'assimilation des acides acycliques est suffisante pour expliquer la valeur énergétique de la cellulose.

II. — VALEUR ÉNERGÉTIQUE DES ACIDES ACYCLIQUES

Un fait certain est que les acides acycliques qui se forment dans la panse ne sont retrouvés ni dans les fèces ni dans les urines (WILSING, 1885, MALLÈVRE, 1891, VON KNIERAM). Cependant, il nous semble difficile de dire jusqu'à quel point ce ne

sont pas les Bactéries ou les Infusoires (LWOFF) qui les utilisent.

Nous n'avons d'ailleurs pas ici l'intention d'étudier le problème très complexe des phénomènes de synthèse ou de dégradation, dans l'organisme, au cours desquels les acides acycliques peuvent apparaître comme stades intermédiaires.

Nous signalerons seulement les travaux de ZUNTZ et MEHRING, de MUNCK, qui, injectant de l'acide lactique, en solution étendue, dans les veines d'un bœuf en état de jeûne, ont constaté que celui-ci était utilisé et évitait la destruction des réserves de lipides. KELLNER également, étudiant avec la technique déjà citée, la valeur nutritive de l'acide lactique, constate que celui-ci amène la production de chaleur seulement; il est oxydé complètement dans l'organisme.

Il est inadmissible que les seuls acides gras soient l'unique source énergétique des Ruminants (WOODMAN). Le raisonnement amène à penser que des sucres intermédiaires doivent se former au cours de la digestion de la cellulose.

III. — TRANSFORMATION DE LA CELLULOSE EN GLUCOSE

WOODMAN, se basant sur un double travail de ARMSBY, d'une part, de LEHMAN, ZUNTZ et MEHRING, d'autre part, pense que certains faits expérimentaux impliquent la formation de glucose dans le tube digestif des Ruminants.

ARMSBY constate que 100 grammes d'un mélange de cellulose et d'amidon, à parties égales, produisent, dans le tube digestif des Ruminants, 4 gr. 7 de méthane. Or la fermentation se produit dans le rumen, avant la digestion diastasique de l'amidon, et porte donc, à la fois, sur la cellulose et l'amidon. LEHMAN et ses collaborateurs constatent, d'autre part que, chez le cheval, il faut 200 grammes du mélange pour obtenir la même quantité de méthane (il se forme en outre un peu d'hydrogène). Or, chez ce dernier, quand se produit la fermentation, qui a lieu dans le cæcum, l'amidon a été entièrement digéré par les amylases. Donc, les 200 grammes du mélange cellulose-amidon, représentent 100 grammes de cellulose-pure. WOODMAN en conclut que la fermentation bactérienne de

50 grammes de cellulose plus 50 grammes d'amidon est équivalente à celle de 100 grammes de cellulose. Pour les deux polyoses le métabolisme de la fermentation doit être le même, avec la même proportion d'énergie perdue sous forme de méthane.

En réalité il nous semble difficile de dire jusqu'à quel point la formation de méthane, dont nous avons vu la contingence, permet de fournir des renseignements précis.

Quoi qu'il en soit il resterait à expliquer le mécanisme même de cette transformation de la cellulose en glucose.

Nous avons déjà signalé les travaux de TETRAULT (1930), de SCOTT, FRED et PETERSON (1930) et surtout de SARLES, FRED et PETERSON qui avaient constaté la formation de petites quantités de sucres réducteurs, en fin de culture, pendant la fermentation de la cellulose par les thermophiles à 60°.

Mais les premiers travaux sont ceux de PRINGSHEIM. Le problème est connexe de celui de l'existence de cellulase bactérienne. Or cette cellulase est, dans les conditions naturelles, une endo-diastrase qui ne diffuse pas dans le milieu de culture. Les filtrats stériles de liquide de fermentation sont sans action sur la cellulose (PRINGSHEIM). S'il existe réellement une diastase transformant la cellulose en glucose, celui-ci, à mesure de sa formation, est utilisé pour le métabolisme bactérien et transformé en acides acycliques et en gaz qui apparaissent seuls dans le milieu de culture. Il s'agit donc, tout en laissant la diastase agir, d'arrêter la prolifération des germes, de tuer la culture.

PRINGSHEIM emploie dans ce but des antiseptiques volatils (ceux-ci doivent en effet être éliminés lors de la recherche du pouvoir réducteur du milieu, seul témoin de la présence de sucre et, corrélativement, de diastase). Il discute la valeur relative du chloroforme, du toluène, du thymol et de l'iodoforme en solution dans l'acétone. Quel que soit l'antiseptique choisi il est ajouté à la culture à l'acmé de la fermentation. Puis celle-ci est laissée pendant quelques jours à 37°.

Les expériences ont porté sur des thermophiles, des dénitrifiants, des bacilles de la fermentation méthanique. Dans tous les cas il a pu mettre évidence, dans la fermentation ainsi

traitée, du cellobiose et du glucose, traduisant ainsi l'existence d'une cellulase et d'une cellobiase.

Il a de plus cherché à séparer l'action de ces deux diastases. Une fermentation par thermophiles, à 55°, est arrêtée par l'iodoforme et refroidie à 20°. Il ne se forme dans ces conditions que du glucose. Si, dans les mêmes conditions, on élève au contraire la température au-dessus de 71° les deux diastases sont détruites ; à 67° la cellobiase est détruite, la cellulase n'est qu'affaiblie.

Dans d'autres expériences sur les thermophiles, il précise qu'un simple abaissement de la température à 20°, même sans l'adjonction d'antiseptiques, suffit pour faire parfois apparaître un certain pouvoir réducteur, d'ailleurs très faible, en rapport avec la lente atténuation de la culture.

De cet ensemble de recherches on peut conclure que chaque fois qu'intervient une modification énergique au cours de la fermentation, il apparaît du glucose dans le milieu. Cette modification doit arrêter la prolifération des germes et tuer la culture. Le taux de sucre produit sera d'autant plus grand que l'action inhibitrice aura été plus brutale.

Ces données d'ordre strictement bactériologique et chimique donnent à penser qu'un phénomène de même ordre doit se produire *in vivo* et expliquer ainsi la formation de glucose dans le tube digestif des Ruminants.

Mais il est bien évident que ni les antiseptiques, ni l'abaissement de température ne peuvent être invoqués chez l'animal. Nous pensons avoir démontré dans la deuxième partie de ce travail que le changement de pH a les mêmes résultats et expliquer ainsi, tout au moins en partie, le phénomène de la nutrition chez les Ruminants.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

I. — ESSAIS D'ISOLEMENT EN CULTURE PURE D'UNE BACTÉRIE CELLULOLYTIQUE DE LA PANSE

1° LES MILIEUX ESSAYÉS. — Au début des essais d'isolement des germes cellulolytiques en culture pure, nous avons, au cours de nombreux tâtonnements, utilisé un assez grand nombre de milieux auxquels était adjoint de la cellulose (papier à filtrer) et qui étaient ensemencés avec du contenu de panse, en aéro-biose et anaérobiose.

Tout d'abord des milieux strictement minéraux du type de celui d'OMELIANSKI, des infusions de foin, des solutions plus ou moins étendues de mélasse de sucrerie contenant des éléments glucidiques et protidiques d'origine végétale plus ou moins dégradés. Dans tous ces milieux les résultats ont été constamment négatifs.

Nous avons surtout cherché à obtenir un milieu de culture se rapprochant du milieu naturel, c'est-à-dire du contenu de la panse.

Tout d'abord le milieu utilisé par Y. KHOUVINE pour la culture de *Bac. cellulosa dissolvens*, modifié comme il est indiqué :

PO ⁴ K ² H.	1 g.
NaCl	1 g.
Peptone pancréatique de viande.	1 g.
CO ³ Ca	2 g.
Filtrat de contenu de panse.	25 cm ³
Eau	975 cm ³

Ici encore les résultats ont été négatifs.

Enfin un milieu aussi semblable que possible à celui de la panse : du contenu de la panse, filtré, étendu d'eau, auquel

était adjoind du carbonate de calcium (sous forme d'écume de sucrerie) et de la cellulose. Ce n'est que dans ce milieu, et en anaérobiose, que la cellulolyse s'est produite. C'est lui que nous avons par la suite utilisé pour l'isolement du germe en culture pure et pour la conservation de celui-ci. Voici la technique précise de sa préparation.

Le contenu de la panse de bœuf, prélevé aux abattoirs aussitôt après que n'animal est abattu, est le plus tôt possible mis dans une petite presse (genre presse-viande) pour en extraire le liquide. Celui-ci est soumis à une centrifugation à grande vitesse pendant une demi-heure ou bien filtré sur coton de verre. Il est ensuite dilué avec de l'eau de conduite ; les proportions optima ont été reconnues être d'une partie de liquide de panse pour deux parties d'eau environ (on verra plus loin l'intérêt que présente cette dilution) ; proportion à varier légèrement, en réalité, suivant la consistance plus ou moins épaisse de la masse pâteuse extraite de la panse. Le liquide ainsi extrait présente un pH aux environs de 8 (plus alcalin en été lorsque les animaux sont nourris au pâturage ; en hiver, les animaux sont nourris de foin et de paille à l'étable).

Pour maintenir, au cours de la culture, cette réaction alcaline, nous avons ajouté de l'écume de sucrerie dont l'élément actif et prédominant est du carbonate de calcium, très finement divisé. Voici, à titre d'indication, l'analyse d'un échantillon d'écume :

H ² O	42,60 p. 100
CO ³ Ca	42,70 —
CaO	0,80 —
P ² O ⁵	1,30 —
SO ⁴ Ca	0,20 —
K ² O	0,05 —
Sucre	0,51 —
Azote total	0,30 —
Matières organiques	5,20 —
Silice	6,34 —

La cellulose est adjointe sous forme de bande de papier à filtrer Durieux III.

Enfin le milieu est réparti en tubes et recouvert d'une couche d'huile de vaseline de 3 centimètres d'épaisseur, puis mis à stériliser. Cette stérilisation doit être très poussée. Nous avons

en effet vérifié la très grande difficulté que l'on rencontre à stériliser du carbonate de calcium contenant des spores d'anaérobies : VAN NIEL signale une fiole contenant un litre de milieu de culture et 2 p. 100 de carbonate de calcium (celui-ci ayant déjà auparavant été stérilisé à sec à 180°), dans laquelle, deux jours après qu'elle avait été stérilisée pendant 15 minutes à 120°, se développe une fermentation sans que la fiole ait été ouverte après la stérilisation. Nous avons donc opéré 3 chauffages successifs, pendant 20 minutes chacun, à l'autoclave à 120°, avec séjour à l'étuve à 37° entre les chauffages ; on s'assurait ensuite de la stérilité de ces tubes avant leur emploi.

2° ISOLEMENT DE LA BACTÉRIE CELLULOLYTIQUE EN CULTURE PURE. —

Au moment de l'emploi ce milieu est privé d'air en mettant les tubes au bain-marie bouillant pendant une demi-heure. La température une fois baissée on ensemence les tubes, par série de 5, avec un fragment, gros comme une lentille, de contenu de panse ; puis on les pasteurise par chauffage à 80° pendant 10 minutes au bain-marie ; la cellulolyse se produit, dans environ un tiers des tubes, après une dizaine de jours de séjour à l'étuve à 37°.

A ce moment l'examen sur lame montre une flore bactérienne extrêmement riche et variée, des cocci et des bacilles prenant le Gram ou ne le prenant pas, avec, en assez grande quantité, des bactéries à spore terminale.

Nous avons tout lieu de penser que c'était ce type de bactéries qui était responsable de la cellulolyse. En effet ces germes à spore terminale n'étaient notés en grande abondance que dans les tubes où s'était produite la fermentation ; ils manquaient par contre complètement, ou étaient en petit nombre, dans les autres. C'est donc à l'enrichissement de la culture en cette bactérie à spore terminale que nous nous sommes appliqués.

Ces essais ont été faits à partir de 5 panses différentes ; les expériences ont été menées parallèlement pour les 5 souches.

L'enrichissement a été obtenu par repiquage en série continue des tubes où se produisait la cellulolyse. Ces repiquages doivent être assez abondants : 1/2 centimètre cube environ pour 25 centimètres cubes de milieu à ensemencer ; ils doivent

de plus contenir des fragments de cellulose en voie d'attaque. Chaque repiquage, fait dans 3 ou 4 tubes, était suivi d'une pasteurisation à 80° pendant 10 minutes. Environ la moitié des ensemencements donnaient un résultat positif. Il était fait à chaque fois un examen sur lame où se vérifiait le grand nombre de bactéries à spore terminale dans les tubes cellulolysés et leur absence dans les autres.

Au bout de 7 passages en série continue la culture était presque pure ; seuls quelques rares cocci prenant le Gram restaient associés à la bactérie à spore terminale. Les cultures vieillies avaient même, à l'examen sur lame, un aspect parfaitement homogène (il est probable en effet, que le milieu, épuisé, ne permettait plus la prolifération que des bactéries cellulolytiques) mais, au repiquage suivant, les cocci réapparaissaient en petit nombre dans les premiers jours de culture pour disparaître ensuite. Pour les éliminer, la méthode de chauffage s'est montrée inefficace.

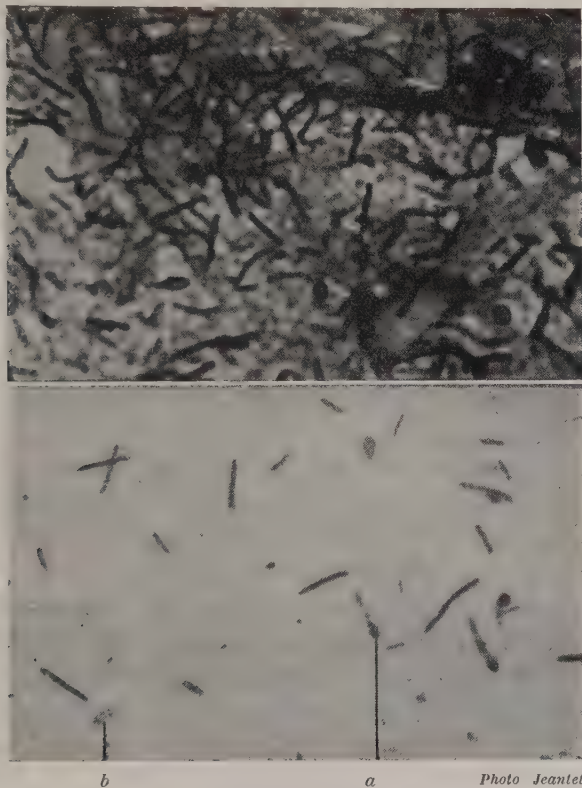
Les essais d'isolement en culture pure, sur milieu solide, se heurtèrent à de nombreuses difficultés. Sur gélose simple additionnée de liquide de panse la bactérie ne pouvait être cultivée. Sur gélose de Veillon les cultures étaient rares et extrêmement maigres. Sur gélose Veillon additionnée de liquide de panse les cultures étaient plus riches, mais ce milieu, très trouble, rendait le prélèvement des colonies difficile. Tous ces essais étaient naturellement faits en anaérobiose, en tubes scellés.

Finalement, c'est avec la gélose Veillon additionnée de petites quantités de liquide de panse que l'isolement a été obtenu après un très grand nombre d'essais infructueux. En effet, les colonies prélevées sur milieu solide, bien qu'elles fussent à l'examen direct formées de la bactérie en question, ne produisaient pas de cellulolyse lorsqu'elles étaient repiquées dans le milieu liquide ; ce fait était vraisemblablement en rapport avec le petit volume de l'ensemencement (difficulté déjà signalée par de nombreux auteurs). Cependant au cours des essais, *une colonie unique* repiquée en milieu liquide donna la cellulolyse.

La pureté de la culture fut vérifiée à l'examen direct et par de nombreux ensemencements en milieux liquides et solides. C'est cette souche qui fut, par la suite, conservée et étudiée.

II. — DESCRIPTION DE PLECTRIDIDIUM CELLULOLYTICUM

1° MORPHOLOGIE MICROSCOPIQUE. — En culture sur le milieu au liquide de panse qui vient d'être décrit, *Pl. cellulolyticum* présente deux aspects morphologiques différents :



En haut : bactéries sur fibres de cellulose en voie de destruction.

En bas : nombreuses formes végétatives non sporulées.

a) forme sporulée (microspore).

b) spore libre (macrospore).

Une forme végétative, bâtonnet non sporulé, de 3 à 4 μ de long sur 0 μ 5 de large, se colorant par la méthode de Gram. Cette forme est mobile et présente des cils qui semblent répartis sur toute la surface du corps microbien.

Une forme sporulée, bâtonnet de 5 à 6 μ de long, immobile, ne se colorant pas par la méthode de Gram. Les spores sont terminales. Il en existe deux types : des microspores, rondes, plutôt Gram-positives, de 1 μ de diamètre ; des macrospores, ovalaires, plutôt Gram-négatives, de 1 à 2 μ de diamètre. Ces deux types de spores coexistent dans la culture soit à l'extrémité des bâtonnets, soit à l'état libre. Les formes sporulées, très nombreuses au début de l'isolement, sont devenues plus rares par la suite.

2° MORPHOLOGIE MACROSCOPIQUE DES CULTURES. — Sur *milieu panse-cellulose* le liquide se trouble légèrement le lendemain de l'ensemencement et, vers le 5^e jour, devient plus pâle et opalescent. Vers le 7^e jour la feuille de papier-filtre se ramollit. Exceptionnellement on voit se former en certains points quelques rares bulles gazeuses. Le ramollissement s'accroît et, vers le 9^e jour, le papier s'affaisse au fond du tube où il disparaît presque complètement en quelques jours. A aucun moment il n'y a de modification de coloration de la cellulose.

En *gélose Veillon* les colonies sont ouatées, blanchâtres, présentant un centre dense avec un pourtour flou. Elles se répartissent sur la hauteur du tube ; à la surface du milieu il se forme une collerette blanche et luisante. Il s'agit donc d'un germe « anaérobie facultatif ».

En *gélose Martin glucosée* les colonies sont blanches, rapidement extensives, à surface irrégulière et luisante, à bords déchiquetés (il s'agit de milieu de culture sans cellulose).

Sur *bouillon Martin glucosé* le liquide se trouble avec formation d'une collerette superficielle fragile et d'un léger dépôt au fond du tube.

3° CARACTÈRES BIOLOGIQUES. — *Résistance à la chaleur*. Cette bactérie sporulée est thermo-résistante. Elle résiste à un chauffage de 5 minutes à 90°, mais est tuée en 2 minutes à 100°.

Résistance à la dessiccation. La bactérie a pu être conservée pendant un an, en gélose de Veillon, tubes non scellés. Repiqués en milieu liquide les germes ainsi conservés ont attaqué la cellulose en 10 jours.

Influence de la température. La cellulolyse a été obtenue

entre 33 et 48 degrés. Mais jusqu'à 35° la vitesse de fermentation est extrêmement faible (délai de 15 jours). Il en est de même au delà de 45°. La température optima est de 41°. Le délai de cellulolyse n'est alors que de 3 jours.

Les essais de culture à des températures supérieures ont toujours été négatifs. A 56°, après 20 jours à l'étuve il n'y a pas de cellulolyse. Il ne s'agit donc pas d'une bactérie thermophile. Si la culture, après un délai de 3 semaines, est ramenée à 37° la fermentation se produit au bout de 10 jours.

De même, quelle que soit la durée de conservation des cultures au-dessous de 33°, la fermentation s'établit lorsqu'on ramène celles-ci à 37°.

Influence de la réaction du milieu (pH). Le milieu de culture d'élection, panse-cellulose, est alcalin. Son pH initial est de 8,5 ou 9 environ (méthode colorimétrique). 24 heures après l'ensemencement il descend à $\text{pH} = 8$ pour atteindre $\text{pH} = 7$ au début de la cellulolyse. Il est à remarquer que ce sont justement les conditions de pH de la pansé, qui est elle même alcaline, entre 7 et 9. Nous n'avons jamais pu obtenir par contre, de cultures dans un milieu dont le pH initial était inférieur à 6,5.

Influence de l'oxygène (rH). — *Pl. cellulolyticum* est un anaérobie facultatif. Nous l'avons cultivé en anaérobiose stricte, dans des tubes où, le vide ayant été fait, la pression ne dépassait pas 6 millimètres de mercure. Nous l'avons également cultivé en milieux largement aérés dans des fioles de FERNBACH. Mais, fait capital, il n'est cellulolytique qu'en anaérobiose. Pratiquement nous opérons sous huile de vaseline à un rH de 3 à 5 environ pour un pH égal à 9 (méthode colorimétrique). Tous les essais de fermentation en aérobiose ont été négatifs, soit qu'il s'agisse d'ensemencement direct avec le contenu de panse, soit que l'on ait utilisé une culture en fermentation active pour ensemercer le milieu aérobie.

Il y a lieu, en effet, d'insister ici sur ce fait important que *Pl. cellulolyticum* présente deux activités biologiques bien distinctes. Une activité générale, dont on verra plus loin l'étendue, et une activité bien spéciale, cellulolytique. Or celle-ci ne se trouve réalisée que dans des conditions précises de pH, de rH, avec une étroite spécificité de milieu : condi-

tions biologiques qui sont justement celles de la panse des Ruminants.

Cette opposition, qui sera traitée plus loin en un chapitre particulier, est simplement signalée ici afin de légitimer la longue liste de milieux qui va suivre, alors que la première partie de ce travail a été consacrée à la recherche d'un milieu bien spécial.

Pouvoir fermentatif. — Les essais de fermentation ont été faits sur : *des alcools* = glycérol, mannitol ; *un pentose* = arabinose ; *des hexoses* = glucose, lévulose, galactose ; *un hexobiote* = saccharose ; les ensemencements ont été faits avec une culture en eau peptonée ; les alcools et les sucres précédemment cités ont tous été attaqués en aérobie et en anaérobie. Le pH initial qui était égal à 7 tombait le cinquième jour à pH = 5,5.

Par contre, des milieux contenant de l'inuline ou de l'amidon, ensemencés en anaérobie et en aérobie, suivant les mêmes techniques, ne se sont pas acidifiés. D'ailleurs, lorsque le milieu panse-cellulose contient de l'amidon, celui-ci est retrouvé à la fin de la fermentation.

Le lait est coagulé en aérobie ; il ne l'est pas en anaérobie.

Pl. cellulolyticum peut être cultivé en eau peptonée. Le milieu se trouble ; il ne se forme pas d'indol (15 passages successifs ont été faits).

La gélatine n'est pas liquéfiée.

Les protides du blanc d'œuf coagulé ne sont pas attaqués.

Pouvoir pathogène. — Les cultures ont été centrifugées et le culot de centrifugation émulsionné dans de l'eau physiologique à 10 p. 1.000 (même volume). Cette émulsion a été injectée à la souris, à la dose d'un demi-centimètre cube par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale, sans aucune réaction. L'injection sous-cutanée ou intraveineuse au lapin (2 centimètres cubes) n'a également amené aucune réaction locale ni générale (1).

(1) Nous tenons à remercier ici M. BÉGAÏN qui, par l'intermédiaire de M. CAULLERY, nous a fourni les écumes de sucrerie dont nous avons eu besoin pour ces expériences.

III. — LES FACTEURS NÉCESSAIRES A « PL. CELLULOLYTICUM » POUR MANIFESTER SON POUVOIR CELLULOLYTIQUE

Lorsque fut isolé *Pl. cellulolyticum* c'est son pouvoir cellulolytique qui fut en quelque sorte le fil directeur des expériences de sélection. Mais très rapidement on s'aperçut qu'il ne s'agissait pas d'un « cellulolytique obligatoire » (comme *Bac. cellulosaë dissolvens* de Y. KHOUVINE), mais, au contraire, « facultatif » ; propriété qui fut d'ailleurs mise à profit pour l'isolement définitif à partir d'une colonie unique en gélose VEILLON additionnée de liquide de panse.

Mais il y avait, par contre, une opposition très marquée entre l'étroite spécificité des facteurs nécessaires pour qu'apparaisse la cellulolyse (facteurs, nous insistons, qui ne furent pas artificiellement créés, mais qui se trouvent justement réalisés dans la panse) et la très grande variété de milieux dans lesquels pouvait végéter *Pl. cellulolyticum*.

FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES. — Nous avons déjà insisté et ne ferons que signaler à nouveau l'influence du pH et du rH du milieu.

Au point de vue pH, *Pl. cellulolyticum* n'est cellulolytique et ne peut végéter que dans un milieu de réaction neutre ou alcaline.

Au point de vue rH il n'est cellulolytique qu'en anaérobiose et végète en aérobiose et anaérobiose.

Facteurs bio-chimiques. — Le milieu « panse-cellulose » était le seul utilisable. C'est le seul milieu où *Pl. cellulolyticum* a pu manifester son pouvoir cellulolytique. Or, compte tenu des nécessités pratiques, c'est le milieu qui se rapproche le plus des conditions biologiques de la panse.

Il nous a semblé que le meilleur moyen de connaître les facteurs biochimiques nécessaires à la cellulolyse était de nous rendre compte de la composition approximative du liquide de la panse. Les essais ont été faits sur le liquide immédiatement après son prélèvement et également sur milieu de culture prêt pour emploi ; il était à prévoir, en effet, que les chauffages

successifs à 120° modifieraient plus ou moins la nature des protides du milieu.

Nous avons utilisé les techniques suivantes :

Extrait sec. — Il a été fait, à froid, par dessiccation dans le vide sulfurique et, à chaud, par évaporation au bain-marie bouillant.

Cendres. — Le liquide a été évaporé au bain-marie bouillant; la masse fut chauffée avec ménagement jusqu'à carbonnement; reprise par l'eau distillée bouillante; d'une part, filtration sur filtre sans cendre, chauffage au rouge vif, pesée; d'autre part évaporation à sec, pesée.

Protides précipitables par l'acide trichloracétique. — L'acide (en solution concentrée) est ajouté goutte à goutte; le précipité est recueilli sur filtre taré, lavé, desséché dans le vide sur l'acide sulfurique et pesé.

Azote total (Méthode de KJELDAHL).

Le dosage a été pratiqué suivant la technique préconisée par G. BERTRAND. A 20 centimètres cubes de liquide on ajoute 5 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré, 5 grammes de sulfate de potassium et un petit cristal de sulfate de cuivre. On chauffe jusqu'à coloration verte (bleu au refroidissement). On ajoute de la soude jusqu'à virage de la phénolphthaléine. On distille l'ammoniaque que l'on dose au fur et à mesure de sa distillation, avec une solution décinormale d'acide sulfurique en présence d'Hélianthine.

Azote ammoniacal (Méthode de FOREMAN).

L'appareil utilisé était ainsi composé : un ballon d'un litre et demi où pénétrait un tube long; celui-ci plongeait presque jusqu'au fond du ballon et était en communication avec un autre ballon contenant de l'eau en ébullition (cette eau avait auparavant été privée de toute trace d'ammoniaque et de CO² par ébullition prolongée une demi-heure); le tube latéral du premier ballon était réuni à l'extrémité supérieure d'un réfrigérant vertical.

Cet appareil était utilisé ainsi : 10 centimètres cubes de liquide alcalin, étaient introduits dans le ballon. On ajoutait 160 centimètres cubes d'alcool à 95° et le ballon était rapidement mis en relation avec le réfrigérant, puis avec le tube d'entraînement par la vapeur d'eau. L'ammoniac entraîné et

distillé était recueilli dans un verre à pied où il était titré au fur et à mesure de sa distillation avec une solution décimale d'acide sulfurique en présence d'Hélianthine.

Nous avons également essayé le dosage de l'azote aminé et de l'azote ammoniacal par la méthode de SÖRENSEN ; mais la coloration brune du liquide rendait impossible la lecture du virage de l'indicateur.

Dosage de l'azote aminé et des polypeptides (Méthode de R. MARTENS appliquée par PEIRIER et NGUYEN KIM-KIN au dosage des acides aminés et des polypeptides dans le Nuoc-mam).

On cherchait tout d'abord la quantité d'acide chlorhydrique décimale nécessaire pour amener 5 centimètres cubes du liquide à un pH égal à 6,8 (indicateur : azolithmine).

Puis dans une fiole jaugée on versait 40 centimètres cubes environ d'alcool à 96°, puis 5 centimètres cubes, exactement mesurés, du liquide à titrer, puis la quantité d'acide chlorhydrique décimale, déjà déterminée, pour amener la réaction à $\text{pH} = 6,8$; enfin on complétait exactement à 55 centimètres cubes avec l'alcool à 96°. Le titre final en alcool de la solution ainsi obtenue correspondait à 80°. La solution était filtrée.

Dans la première partie du dosage on ajoutait à 25 centimètres cubes du filtrat X gouttes de thymol-phthaléine (solution alcoolique à 0,25 p. 100) et on amenait au pH de 9,3 (virage au bleu) au moyen de soude décimale. La quantité de soude ainsi ajoutée permettait de calculer les carboxyles des acides aminés et des polypeptides (A).

Dans la deuxième partie du dosage on ajoutait alors X gouttes de rouge de méthyle (solution alcoolique à 0,25 p. 100). Le liquide devenait vert jaunâtre, puis on amenait à $\text{pH} = 5,5$ avec de l'acide chlorhydrique décimale (teinte rougeâtre du liquide comparée à celle d'un témoin constitué par un mélange de tampons de phosphates au même pH). La quantité d'acide chlorhydrique ainsi ajoutée permettait de calculer la valeur des groupements aminés (B).

Enfin, dans la troisième partie du dosage, on reprenait 25 centimètres cubes de la solution alcoolique filtrée auxquels on ajoutait 17 centimètres cubes d'eau bouillie ; le titre de la solution alcoolique ainsi obtenue était environ de 50°. On ajou-

tait alors X gouttes de phénolphtaléine et on amenait à pH 8,2 au moyen de soude décijnormale. La quantité C de soude ajoutée permettait de calculer les carboxyles des acides aminés D suivant ces deux formules :

$$D = \frac{(A - C) 100}{77},$$

azote des polypeptides = A — D.

RÉSULTATS. — Le tableau suivant donne les résultats des divers essais sur le liquide de panse immédiatement après son prélèvement.

Extrait sec à froid	1 g. 65
Extrait sec à chaud (100°)	1 g. 53
Cendres	0 g. 93
Chlorures (en NaCl)	0 g. 58
Phosphates (en P ² O ⁵)	0 g. 07
Sulfates	Traces non dosées
Protides précipitables par CCl ³ — COOH	0 g. 2
Azote total (KJELDAHL).	0 g. 04
Azote ammoniacal.	0 g. 018
Azote aminé (MARTENS-PEIRIER)	0 g. 019

La répartition des substances azotées, par la même méthode, est la suivante :

Acides diaminés	5 p. 100
Acides monoaminés	6 p. 100
Polypeptides	89 p. 100

Nous avons également recherché la présence d'acides acycliques volatils. Après acidification au moyen de l'acide tartrique et élimination du précipité formé, suivant la technique classique, la distillation de DUCLAUX a permis de construire une courbe intermédiaire à celles de l'acide acétique et de l'acide propionique. Nous n'avons pas cherché à déterminer la nature et les proportions des divers acides acycliques. En effet il s'agit d'une fermentation impure, extrêmement variable. Pratiquement, de l'acide formique à l'acide caproïque, tous les acides acycliques volatils ont été mis en évidence dans la panse. L'acidité totale (acides acycliques volatils exprimés en acide chlorhydrique normal) est de 0 cm³ 75 en moyenne par 100 centimètres cubes de liquide.

Nous avons également recherché la présence d'acides organiques non volatils (lactique et succinique). Ces acides n'ont pu être mis en évidence.

Les mêmes essais ont été faits sur le milieu de culture prêt pour l'ensemencement. Ils ont donné les mêmes résultats pour tous les éléments, sauf l'azote. Les chiffres suivants correspondent au milieu supposé non dilué afin de permettre une comparaison plus facile avec le tableau précédent :

Protides précipitables par $\text{CCl}_3\text{-COOH}$	0 g. 46
Azote total	0 g. 05
Azote ammoniacal	0 g. 011
Azote aminé	0 g. 02

La répartition des substances azotées, par la même méthode, est la suivante :

Acides diaminés	29 p. 100
Acides monoaminés	31 p. 100
Polypeptides	40 p. 100

Donc la composition du milieu utilisé marque une différence sensible avec celle du contenu de la panse. En effet ces chiffres montrent, d'une part, une diminution du taux de l'azote ammoniacal et, corrélativement, de l'azote total ; d'autre part une dégradation beaucoup plus avancée des protides : diminution des protides précipitables par l'acide trichloracétique et des polypeptides, augmentation des acides aminés. Ces différences sont certainement dues à un phénomène d'hydrolyse déterminé par les stérilisations successives à 120° , avec une réaction alcaline ($\text{pH} = 8,5$).

En résumé, voici quels sont les résultats donnés par les divers essais pour le milieu de culture tel qu'il est employé (dilution au tiers). Les chiffres correspondent à 100 centimètres cubes de liquide.

Extrait sec à froid	0 g. 55
Extrait sec à chaud (100°)	0 g. 51
Cendres	0 g. 31
Chlorures (en NaCl)	0 g. 19
Phosphates (en P^{20}_3)	0 g. 02
Sulfates	Traces non dosées
Protides précipitables par $\text{CCl}_3\text{-COOH}$	0 g. 05
Azote total	0 g. 02
Azote ammoniacal	0 g. 003
Azote aminé	0 g. 006
Acides diaminés	29 p. 100
Acides monoaminés	31 p. 100
Polypeptides	40 p. 100

CONSIDÉRATIONS SUR LES FACTEURS NÉCESSAIRES A LA CELLULOLYSE. —

Un pareil milieu est caractérisé, au point de vue biologique, par sa grande pauvreté en éléments nutritifs (l'extrait sec est extrêmement faible), par la présence d'azote fourni à la fois sous forme ammoniacale et sous forme aminée, celle-ci, d'ailleurs, étant à un degré de dégradation assez avancé.

Donc, en résumant les facteurs nécessaires à *Pl. cellulolyticum* pour manifester son pouvoir cellulolytique, on peut retenir : milieu alcalin, anaérobiose, pauvreté du milieu de culture, azote ammoniacal, azote organique. Il faut d'ailleurs remarquer que le milieu n'était pas parfait ; la cellulolyse, au début de l'isolement et lors des premiers repiquages, ne se réalisait, en moyenne, que dans un tube sur deux. Peut-être faut-il attribuer ce fait à des facteurs non mis en évidence par l'analyse chimique ; nous pensons plutôt que la raison en est la différence décelée dans l'état de l'azote aminé entre le milieu utilisé et le contenu de panse proprement dit, et surtout la destruction, lors du chauffage, de substances activantes. Cependant, en raison des difficultés considérables rencontrées pour filtrer sur bougie CHAMBERLAND ou BERKFELD un pareil liquide, nous avons continué à utiliser un milieu stérilisé par chauffage.

Nous avons voulu nous rendre compte jusqu'à quel point cette spécificité du milieu était stricte, en faisant varier celui-ci dans des proportions plus ou moins grandes.

Tout d'abord par simple enrichissement ou appauvrissement du milieu en éléments nutritifs, sans faire varier ceux-ci, c'est-à-dire en modifiant les rapports de liquide de panse et d'eau : la courbe suivante montre un optimum qui est à la fois limite inférieure de concentration et, d'autre part une augmentation progressive du délai de cellulolyse lors de l'enrichissement en éléments nutritifs.

Nous interprétons le fait en pensant que les éléments en solution dans le milieu permettent la prolifération rapide des germes et leur action sur la cellulose lorsque ces éléments sont épuisés. Plus le milieu est pauvre, plus ce moment est vite arrivé et plus la cellulolyse est précoce. Le minimum de concentration correspond justement au minimum d'éléments nutritifs nécessaires à la prolifération des germes.

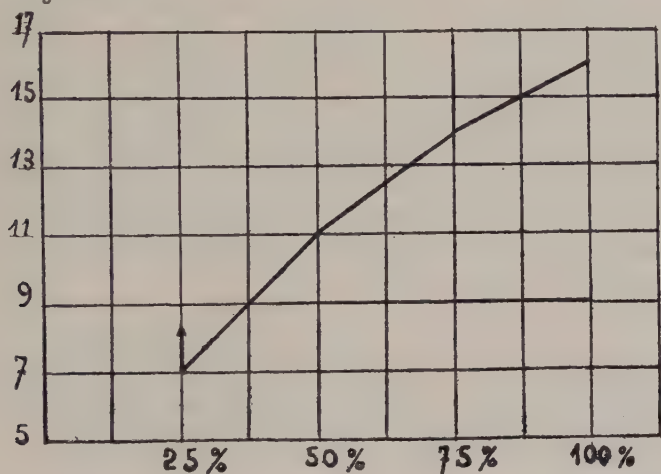
Il n'y a pas contradiction entre cette hypothèse et le fait que

la panse travaille à la concentration maxima, car le rapport de la quantité de cellulose à celle du liquide y est beaucoup plus grand que dans nos tubes.

Nous avons également cherché l'effet de l'enrichissement du milieu en d'autres éléments nutritifs : glucides (glucose), azote aminé (peptone végétale), azote ammoniacal. Dans tous les cas le résultat a été le même : les faibles doses retardent la cellulolyse, les fortes doses l'empêchent.

A ce point de vue, donc, *Pl. cellulolyticum* rentre dans le

délai de cellulolyse
en jours



Concentration
en liquide de panse

cadre général des germes dont le pouvoir fermentaire, vis-à-vis d'un corps donné, est lié au déséquilibre des constituants du milieu : richesse en l'élément à fermenter, pauvreté en autres éléments nutritifs.

Est-ce à dire que le nom de « cellulolytique » ne puisse être attribué à *Pl. cellulolyticum* ?

La technique, qui a, en somme, été utilisée est celle préconisée par WINOGRADSKY : isolement par la fonction physiologique. Il ne s'agit pas de l'isolement artificiel d'un germe qui,

parmi d'autres propriétés, aurait celle d'être cellulolytique, à l'état potentiel, dans certaines conditions. Tout germe a un certain nombre de facultés A. B. C. D... Dans certaines conditions A est efficient, B. C. D... sont potentiels. Dans d'autres conditions B sera efficient, A. C. D... potentiels, etc. Il serait artificiel d'isoler avec le deuxième type de conditions un germe qui, dans la nature, serait dans les premières conditions et de lui attribuer B comme faculté normale. Nous nous sommes placés dans les conditions biologiques de la panse. Dans ces conditions le pouvoir cellulolytique est efficient, les pouvoirs glycolytique, galactolytique, peptidolytique sont potentiels.

Le problème est en réalité beaucoup plus complexe; d'autres expériences, exposées au chapitre suivant nous ont permis de mettre en évidence un fait nouveau.

À côté des potentialités immédiatement utilisables quand les conditions nécessaires à leur mise en évidence sont réalisées, il est d'autres potentialités dont l'efficiencé n'est possible qu'après un certain entraînement. S'agit-il alors de la mise en évidence de potentialités profondément cachées ou de l'acquisition de propriétés nouvelles? Nous dirons pourquoi nous penchons vers la première hypothèse.

IV. — MODIFICATION PROGRESSIVE DES FACTEURS NÉCESSAIRES À LA CELLULOLYSE. — TRANSFORMATIONS ADAPTATIVES DE « PL. CELLULOLYTICUM ».

Nos expériences nous avaient conduit, pendant plusieurs mois, sur une toute autre partie de notre travail et nous n'avions pu suivre avec la même attention les besoins nutritifs de notre bactérie, quand, pour un autre but, ayant ensemencé un tube en aérobiose, nous avons eu la surprise de voir la cellulolyse s'y produire, avec, toutefois, un retard assez important.

Nous avons alors repris leur étude, considérée antérieurement comme terminée, et nous avons assisté à leur transformation progressive; la cellulolyse a pu, peu à peu, être réalisée dans des conditions tout à fait différentes de celles du milieu primitif.

La culture avait été conservée, à l'état pur, de janvier 1933

à avril 1934, soit quinze mois. Pendant tout ce temps les repiquages de la souche avaient été faits en série linéaire et continue, tous les dix jours environ.

Comme nous l'avons dit, les conditions de rH se sont modifiées les premières ; la cellulolyse se produit actuellement, quoiqu'avec un rendement bien inférieur, en aérobiose et même en milieu largement aéré (fiole de FERNBACH).

Le pH est également moins strict et, en milieu sans carbonate de calcium, il y a cellulolyse, à rendement d'ailleurs très faible, alors que le pH baisse rapidement jusqu'à $\text{pH} = 6$ (le lendemain de l'ensemencement) et atteint $\text{pH} = 5$. Mais il est nécessaire que, au moment de l'ensemencement le pH soit égal à 7 ou 7,5.

Enfin les facteurs biochimiques nécessaires à la cellulolyse se sont également modifiés.

En effet nous avons cherché à réaliser un milieu semi-synthétique se rapprochant le plus possible de celui « panse-cellulose », en y mettant les éléments que l'analyse nous y avait montrés. Nous n'avions cependant l'espoir que d'en donner une image très approchée. Le milieu utilisé a été le suivant :

Peptone végétale pepsique 6 (VAILLANT)	4 g. 3
$\text{PO}^4\text{Na}^2\text{H}$ (cristallisé)	0 g. 20
KCl (cristallisé)	4 g.
SO^4Mg (cristallisé)	0 g. 45
Lactate d'ammonium (solution à 50 p. 100)	4 g.
Eau de conduite	1.000 g.

La peptone est une peptone pepsique d'arachide (6 heures de digestion pepsique ; nous avons également, d'ailleurs, utilisé une peptone de 24 heures) dont la composition est la suivante (A. BERTHELOT) :

Chlorure p. 100 (en NaCl)	4,4
Cendres p. 100.	8,2
Phosphates des cendres p. 100 (en P^2O^5).	4,36
Glucides (en glucose) p. 100.	44
Azote total (KJELDAHL)	6,28
Composés à noyaux guanidiques (procédé SAKAGUCHI) p. 100 (en arginine)	5,5
Amidon	présence
Albumoses	forte proportion d'albumoses primaires et secondaires
Peptone vraie de KÜHNE	présence
Acides aminés libres	0

Ce milieu est vraisemblablement bien différent encore du milieu « panse-cellulose » dans le détail de la dégradation des éléments organiques et ne contient pas de sels d'acides acycliques volatils. Or, après ensemencement avec notre souche ancienne, la cellulolyse s'est produite après un délai de 12 jours environ.

L'expérience témoin consistant à ensemercer directement ce milieu avec du contenu de panse a été négative.

Après plusieurs repiquages en série continue dans ce milieu, nous avons cherché, tout en conservant la cellulolyse, à faire varier les facteurs azotés nécessaires. Les expériences ont alors été conduites de façon systématique, continue et progressive. Il s'est agi d'un véritable « entraînement » (« training » des auteurs anglais) de la bactérie à se contenter de milieux de plus en plus simples.

L'appauvrissement en sources azotées a été conduit suivant deux voies différentes.

Dans un premier type de milieux, l'azote était fourni seulement sous forme aminée (peptone végétale pepsique). Très rapidement la cellulolyse y a été possible, en aérobiose et en anaérobiose, avec et sans carbonate de calcium. Mais l'absence simultanée de plusieurs facteurs favorables fait d'autant plus baisser le taux de la cellulolyse. C'est ainsi que dans un milieu ne contenant de l'azote que sous forme aminée, en aérobiose et sans carbonate de calcium, ce taux ne dépasse guère 20 p. 100.

Dans un deuxième type de milieux l'azote était fourni seulement sous forme de sels d'ammonium.

Tout d'abord seuls les sels organiques d'ammonium ont été utilisables (les lactates, succinates, citrates d'ammonium ont été essayés). Au contraire, le nitrate d'ammonium ne permettait qu'une cellulolyse très tardive et très peu poussée. Puis des repiquages en série continue ont été faits dans des milieux où, à doses égales d'azote, on a fait baisser progressivement les sels organiques d'ammonium et augmenter le nitrate d'ammonium. Après un certain nombre de passages nous avons obtenu la cellulolyse à un taux de 40 p. 100 dans un milieu ne contenant que du nitrate d'ammonium (comme azote). Mais il a toujours été nécessaire d'opérer en présence de carbonate de calcium, l'acide nitrique libéré empêchant, à l'état

libre, toute culture. La souche a pu, jusqu'à présent, être conservée pendant neuf passages dans ce milieu.

Puis nous avons fait de nombreux essais pour obtenir une culture dans un milieu où la seule source d'azote était du nitrate de sodium ou de potassium. Tous ces essais ont jusqu'à présent été sans résultats. Nous n'avons pu mettre en évidence le pouvoir dénitrifiant.

En résumé, si l'on se borne à la simple description des faits, on peut écrire ainsi l'histoire de *Pl. cellulolyticum* :

Germe isolé du contenu de la panse de bœuf et présentant dans ce « milieu biologique » (nous entendons ainsi l'ensemble des propriétés physiologiques, physico-chimiques, biochimiques de l'habitat de la bactérie) un pouvoir cellulolytique efficient : présentant également, dans d'autres milieux, d'autres pouvoirs efficients qui étaient à l'état potentiel dans la panse ; présentant enfin, après un entraînement progressif, d'autres pouvoirs encore dont le plus caractéristique est la synthèse de ses protides à partir des seuls sels minéraux d'ammonium (neuf passages successifs).

Ce serait donc une augmentation limitée du pouvoir de synthèse qui a été observée, (tout au moins apparente).

Du point de vue de l'utilisation du carbone il n'y a eu aucune modification. *Pl. cellulolyticum* peut utiliser une source de carbone (glucide) différente de la source azotée, ou, au contraire, commune (peptide). Ce dernier fait est d'ailleurs constant chez les Bactéries, les Levures et les Champignons, chaque fois qu'un acide aminé ou une peptone est utilisable, il n'y a jamais besoin d'une source carbonée supplémentaire (organismes haplomésotrophes de Lwoff). Cependant l'utilisation de la cellulose comme source accessoire de carbone n'a primitivement été possible qu'en anaérobiose ; elle était liée à l'utilisation de l'oxygène combiné à l'exclusion de celle de l'oxygène moléculaire.

Du point de vue de l'utilisation de l'azote nous avons au contraire constaté de profondes modifications, une augmentation partielle du pouvoir de synthèse : la source d'azote a d'abord été obligatoirement une substance organique complexe, très probablement associée à des substances activantes. Puis l'azote d'une substance organique complexe a été utilisable

en dehors de substances activantes associées. Enfin *Pl. cellulolyticum* a pu constituer ses protides à partir de composés organiques, puis minéraux, d'ammonium.

Or, les stades de cette évolution, que nous avons vu se produire, sur une même souche, présentent des analogies très nettes avec certains types de Bactéries considérées du point de vue de leur pouvoir de synthèse.

LWOFF, en effet, propose de classer les Bactéries en quatre groupes :

1) Bactéries capables de proliférer à partir de composés minéraux, fixant le carbone du gaz carbonique, grâce à l'oxydation de corps azotés minéraux.

2) Bactéries ayant besoin de corps organiques simples : azote moléculaire en présence de glucides, nitrates en présence d'une source azotée convenable, sels d'ammonium associés à du carbone sous forme de glucides, ou bien encore acides aminés divers.

3) Bactéries ayant besoin de corps azotés complexes (peptones).

4) Bactéries ayant besoin de corps azotés complexes associés à des substances activantes.

On constatera que *Pl. cellulolyticum* a d'abord appartenu au quatrième groupe, puis au troisième, enfin au second, tout au moins d'une façon passagère.

Le passage du quatrième au troisième groupe est d'ailleurs un fait banal ; un grand nombre de germes, au sortir de l'organisme, ne peuvent être cultivés que sur milieu au sang ou au sérum, puis, après quelques repiquages, prolifèrent sur les milieux à corps azotés complexes seuls (*Staph. ærogenes*, par exemple, A.-R. PRÉVOT).

Les phénomènes adaptatifs que nous avons notés sont plus étendus ; cependant il est un stade que cette adaptation n'a pu dépasser : tous les essais pour faire apparaître le pouvoir dénitrifiant ont été, dans les conditions de nos expériences, négatifs. Or, le pouvoir dénitrifiant est toujours, au cours de la dégradation physiologique, le premier à disparaître : la réduction des nitrates est la fonction qui demande le plus grand travail énergétique (LWOFF). Les variations se font dans des limites précises que l'on ne peut dépasser. Pour en sortir

il faudrait passer du domaine de l'évolution continue au domaine, tout à fait différent, de l'évolution discontinue.

Il faut noter que cette adaptation s'est faite dans le sens d'une augmentation partielle du pouvoir de synthèse. Or, l'Evolution se fait, d'après les classiques, dans le sens d'une dégradation (Lwoff l'a montré pour la série Chlorophytes → Leucophytes → Protozoaires). « La direction de l'Evolution se poursuit dans le sens d'une dégradation, c'est-à-dire d'une diminution et d'une perte de fonctions... BATESON considère l'évolution comme une simplification » (Lwoff).

Or, le fait que nous avons observé, d'une augmentation apparente du pouvoir de synthèse, n'est pas isolé : *Str. anaerobius* ne se cultive primitivement pas sur milieu synthétique (créatine ou histidine comme unique source d'azote) ; après plusieurs repiquages sur eau peptonée il peut se cultiver sur milieu contenant plusieurs acides aminés, puis de la créatine seule (passage du troisième au second groupe) (A.-R. PRÉVOT).

Est-il possible de faire rentrer les modifications se faisant dans le sens d'une augmentation partielle du pouvoir de synthèse, dans le cadre général de l'Evolution ?

Nous proposons l'interprétation suivante : les caractères de *Pl. cellulolyticum*, tel qu'il se présente après 1 an 1/2 de culture (c'est-à-dire au stade en quelque sorte « fixe », suivant l'expression de PRÉVOT) sont ceux d'une Bactérie cellulolytique du sol. Son cycle biologique serait le suivant : *Pl. cellulolyticum* serait primitivement une Bactérie cellulolytique du sol, à pouvoir de synthèse élevé ; transporté dans le tube digestif des Ruminants, dans un milieu très spécial, devenant parasite, il perd peu à peu une partie de son pouvoir de synthèse (ou tout au moins celui-ci passe à l'état latent) pour, finalement, ne pouvoir utiliser qu'une source complexe d'azote en présence de substances activantes ; remis en milieu artificiel il récupère peu à peu son pouvoir de synthèse.

Il est vrai que cette hypothèse se heurte à une autre difficulté : si l'on veut superposer, comme le font certains auteurs, les faits d'Evolution bactérienne à ceux de l'Evolution et de la Génétique en général (peut-on utiliser ces termes pour des êtres se reproduisant par scissiparité, sans sexualité ?) on est obligé d'admettre l'irréversibilité des variations. Des faits de

cet ordre ont d'ailleurs été mis en évidence chez les Bactéries : passage de l'anaérobiose à l'aérobiose ; souche asporogène de *Bac. anthracis* (CHAMBERLAND et ROUX), variété blanche de *B. prodigiosus* EHRENBER. LWOFF étudiant l'évolution, irréversible, des phénomènes liés au plaste ou à un support morphologique quelconque, et généralisant à celle des phénomènes sans support morphologique, conclut également à l'irréversibilité de ceux-ci.

De fait (WOLLMAN) toute une série d'observations sur le bactériophage (LEGROUX et KEMAL DJEMIL), sur le virus de la « mosaïque » (DUGGAR et ARMSTRONG), sur les faits d'acquisition de propriétés nouvelles de Bactérie à Bactérie (parahérédité de WOLLMAN) permettent d'attribuer à certains ferments cellulaires une nature corpusculaire, discontinue (de 12 à 75 μ pour les facteurs lysogènes).

L'irréversibilité de la perte d'un pouvoir dont la base serait un ferment, à l'échelle morphologique, autocatalytique, est logique ; même, on ne pourrait concevoir qu'il en soit autrement. La transmission héréditaire d'un pareil ferment ressemblerait singulièrement à la transmission héréditaire des « gènes » puisque l'on admet la nature fermentaire, autocatalytique de ceux-ci (HAGEDOORN-CAULLERY-GUYENOT).

Il ne semble pas que l'ensemble des phénomènes d'évolution bactérienne soit aussi directement calquable sur ceux de l'évolution et de la génétique des êtres sexués.

En particulier les faits que nous avons observés ne semblent pas cadrer avec eux. Le pouvoir de synthèse, perdu, ou masqué, dans la phase parasitaire, a été récupéré, tout au moins en partie, dans les milieux ordinaires ; la dégradation n'a pas été irréversible.

Aussi semble-t-il plus prudent de décrire, avec MARCHAL J. G., sans vouloir superposer l'évolution bactérienne à l'Evolution et à la Génétique en général, trois types de variations bactériennes :

1° Des modifications passagères (accomodats) résultent d'une action modificatrice de courte durée. Le changement disparaît avec sa cause.

2° Des modifications de durée, variations à retentissement

prolongé (Dauernmodifikation) qui survient quelque temps à l'action modificatrice.

3° Des modifications durables, irréversibles, véritables mutations qui fixent définitivement un caractère.

Les modifications de *Pl. cellulolyticum* au cours de sa culture *in vitro* rentrent dans le deuxième groupe. La perte du pouvoir de synthèse a survécu un an, à l'action du milieu de la panse, ce qui représente un nombre considérable de générations. Une barrière doit être établie entre les phénomènes des groupes deux et trois; c'est à cette barrière que nous nous sommes heurtés en essayant de faire acquérir à *Pl. cellulolyticum* un pouvoir dénitrifiant. C'est que cette barrière, avons-nous dit, établit la limite entre le domaine des modifications réversibles et le domaine de l'évolution discontinue et irréversible.

CHAPITRE II

MÉTABOLISME COMPARÉ DE LA FERMENTATION DE LA CELLULOSE *IN VIVO* ET DE LA FERMENTATION *IN VITRO* PAR *PL. CELLULOLYTICUM*

Nous avons, dans le chapitre précédent, recherché s'il existait dans la flore de la panse de bœuf et de mouton une bactérie qui soit cellulolytique en culture pure. Cette bactérie a été isolée. Quatre essais ont été faits sur des panses différentes avec la même technique ; c'est toujours le même germe que nous avons obtenu. Nous supposons donc que c'était là une bactérie constante dans le rumen et pensions qu'elle était redevable, effectivement, des phénomènes digestifs qui y ont lieu. Pour vérifier cette hypothèse nous avons cherché à comparer, d'une part, le métabolisme de la fermentation dans la panse et, d'autre part, celui de la fermentation que nous réalisions, *in vitro*, avec la culture pure de *Pl. cellulolyticum*. On verra la grande similitude des deux processus.

De plus l'étude de cette fermentation permet de mieux connaître et définir *Pl. cellulolyticum* et de mieux fixer sa place dans la systématique bactérienne.

I. — MÉTABOLISME DE LA FERMENTATION DANS LA PANSE

Il nous suffira de rappeler ici les données classiques sur cette fermentation, données que nous avons nous-même vérifiées dans le chapitre précédent : la dégradation de la cellulose, sous l'influence des Bactéries cellulolytiques anaérobies y est poussée jusqu'à l'obtention, d'une part, de gaz (hydrogène-

méthane, gaz carbonique), d'autre part, d'acides gras volatils (formique-acétique-butyrique-propionique-valérianique-caproïque). La fermentation n'y est pas pure. Les interréactions entre les Bactéries de toutes natures qui pullulent dans la panse, entre Bactéries et Infusoires, expliquent cette grande variabilité. Enfin, les proportions variables des corps observés sont également fonction de la nature des aliments ingérés : cellulose fraîche (herbe jeune, riche, de plus, en protides), cellulose fraîche imprégnée de lignocellulose (herbes âgées), cellulose imprégnée de lignocellulose et de silice (foin-paille), alimentation riche en amidon.

C'est ainsi que MARKOFF signale des proportions variables de gaz suivant la présence en plus ou moins grande quantité de l'amidon :

Alimentation pauvre en amylacés.

CO ²		54 p. 100
CH ⁴		42 p. 100
H ²		4 p. 100

Alimentation riche en amylacés.

CO ²		87 p. 100
CH ⁴		22 p. 100
H ²		20 p. 100

Mais, en dehors de cette variabilité, le point important est l'absence complète de produits intermédiaires, en particulier de tout sucre réducteur, entre la cellulose et les acides acycliques.

L'étude du métabolisme de la fermentation de la cellulose, *in vitro*, par *Pl. cellulolyticum*, va nous montrer la très grande analogie de ces deux fermentations. Il ne saurait être question d'identité, en raison des faits énumérés plus haut.

II. — MÉTABOLISME DE LA FERMENTATION « IN VITRO » PAR « PL. CELLULOLYTICUM »

Une vingtaine de fermentations ont été faites en milieu contenant du carbonate de calcium, ou n'en contenant pas, en anaérobiose et en aérobiose. Les résultats ont été, qualitativement, à peu près constants. Après un certain nombre d'essais

nous nous sommes placés, pour établir un bilan de la fermentation, dans les conditions les plus favorables à la cellulolyse (anaérobiose en présence de carbonate de calcium).

Le milieu utilisé pour ces expériences n'a pas été le milieu « panse-cellulose » ; en effet celui-ci contient déjà par avance presque tous les éléments du métabolisme de la fermentation. Nous nous sommes servis du milieu semi-synthétique indiqué au chapitre précédent.

Les expériences ont été faites dans de grands ballons de trois litres, à 37° : les uns, pour établir des bilans quantitatifs, avec un poids connu de cellulose dans un volume connu de milieu (rapport aux environs de 1 gramme de cellulose par 100 centimètres cubes de milieu) ; les autres, pour caractériser les produits solubles, avec de grands volumes ensuite concentrés.

Cette étude sera faite en deux parties. Dans une première partie nous étudierons les divers corps formés et leurs variations en fonction des conditions de l'expérience ; dans une deuxième partie, nous plaçant dans les conditions optima, nous donnerons le bilan type de la fermentation.

A) TAUX DE CELLULOLYSE. — Il a été mesuré en cas de fermentation soit anaérobie (avec et sans carbonate de calcium), soit aérobie (avec et sans carbonate de calcium).

Pour la *fermentation anaérobie en présence de carbonate de calcium* la technique a été la suivante : cellulose sous forme de papier filtre Durieux desséché dans le vide sulfurique et pesé ; anaérobiose réalisée soit par désaération, avant ensemencement (ébullition pendant une demi-heure sous huile de vaseline) soit par ébullition à 37°, après ensemencement, sous la trompe à eau (1 centimètre de mercure). Le carbonate de calcium, sous forme d'écume de sucrerie, était mis en quantité juste suffisante et, après fermentation, le dépôt très faible restant au fond du ballon était traité par l'acide chlorhydrique déci-normal, filtré, séché et pesé.

Dans ces conditions la cellulose est entièrement détruite au bout d'un mois. Le résidu est presque nul. Le taux de cellulolyse varie entre 90 et 100 p. 100.

Pratiquement, en anaérobiose et dans un milieu maintenu

constamment alcalin, *Pl. cellulolyticum* détruit entièrement la cellulose mise en fermentation.

Pour la *fermentation en aérobiose en présence de carbonate de calcium*, les résultats sont presque identiques. Mais les phénomènes sont retardés : la cellulolyse ne commence qu'après une douzaine de jours et la destruction n'est complète (95 p. 100) qu'après un mois et demi.

Pour la *fermentation en anaérobiose sans carbonate de calcium* le début de la fermentation est plus tardif encore (quinze jours). Il reste toujours une grande quantité de cellulose non attaquée. Le taux de cellulolyse est de 50 p. 100.

Enfin pour la *fermentation en aérobiose sans carbonate de calcium* le taux de la cellulolyse ne dépasse jamais 20 p. 100, 10 p. 100 parfois.

B) TRANSFORMATIONS SUBIES PAR LA CELLULOSE. — Les expériences ont été faites, pour les fermentations laissant un dépôt de cellulose assez abondant, sur ce dépôt, et, pour les fermentations où le résidu de cellulose est faible ou nul, sur les débris de papier-filtre prélevés au cours de la cellulolyse.

Nous avons recherché tout d'abord la formation d'oxycellulose suivant la technique préconisée par WINOGRADSKY :

Recherche de la solubilité dans les alcalis étendus.

Action des colorants basiques (20 minutes dans une solution de bleu de méthylène à 0,05 p. 100 ; lavage à l'eau pendant 24 heures). L'oxycellulose retient les colorants basiques.

Action des colorants acides. Même technique avec le Ponceau de xylidine. L'oxycellulose ne retient pas les colorants acides.

Enfin, recherche d'un pouvoir réducteur éventuel avec la liqueur cupro-potassique suivant la technique de G. BERTRAND.

Toutes ces expériences ont été entièrement négatives, aussi bien dans les fermentations anaérobies, comme il fallait s'y attendre, que dans les aérobies. Il ne se forme pas d'oxycellulose.

Nous avons de plus cherché si, à l'hydrolyse ménagée, les fibres de cellulose déjà attaquées ne donnaient pas de corps réducteurs. Des débris de papier-filtre provenant des 4 modalités de fermentation énumérées plus haut, ont été soumis à l'hy-

drolyse ménagée à froid, pendant 24 heures par la soude et par l'acide chlorhydrique en solution décijnormale, ou à la même concentration pendant 1 heure à 100°. Puis pour chaque essai le filtrat a été neutralisé en présence de phénolphtaléine. En aucun cas les liquides ainsi obtenus n'ont réduit la liqueur cupropotassique.

Il ne nous a donc pas été possible de mettre en évidence, par les techniques utilisées, un stade intermédiaire de modification chimique de la fibre cellulosique pendant la fermentation.

C) CORPS NEUTRES VOLATILS. — La technique utilisée a été la suivante : en fin de fermentation les liquides neutres des cultures ont été distillés. Le premier tiers a été recueilli. On y a recherché divers corps neutres volatils par les essais suivants :

Action sur l'acide azotique et le bichromate de potassium à 0,5 p. 100, pour la recherche d'un alcool ou d'un aldéhyde.

Action sur le nitrate d'argent ammoniacal pour la recherche d'un aldéhyde.

Formation de cristaux d'iodoforme en présence de réactif iodoioduré (KI à 2 p. 100, I à 1 p. 100) et de lessive de soude (2 gouttes pour 2 centimètres cubes) à 50°.

Action sur le réactif mercurique de DENIGÈS, pour la recherche d'une cétone.

Recherche de l'acétyl-méthyl-carbinol par réduction à froid de la liqueur cupropotassique ou par formation de cristaux, à caractères définis, avec l'acétate de phényl-hydrazine, et surtout par la réaction de LEMOIGNE.

Quelles que soient les conditions de la fermentation, les composés à fonction aldéhydique et cétonique n'ont jamais été mis en évidence. Par contre nous avons trouvé de l'alcool dans les fermentations faites en présence de carbonate de calcium. Nous avons dosé colorimétriquement, par comparaison avec une échelle étalon d'alcool éthylique, les quantités d'alcool ainsi formé (réduction du bichromate sulfurique). Elles sont assez variables :

en anaérobiose, environ 15 p. 100 du poids de cellulose disparue,

en aérobiose, environ 25 p. 100.

D) ACIDES ACYCLIQUES NON VOLATILS. — Le liquide de fermentation sans carbonate de calcium et sans sel organique d'ammonium a été concentré au bain-marie, puis épuisé par l'éther; celui-ci a été évaporé, le résidu repris par l'eau. La solution aqueuse ainsi obtenue a toujours eu une réaction neutre. Il ne se forme pas d'acides organiques non volatils dans les conditions où nous nous sommes placés.

E) ACIDES ACYCLIQUES VOLATILS. — De très nombreux essais ont été faits, car les résultats étaient variables d'une expérience à l'autre et il était difficile de tirer des conclusions précises sur la nature et les proportions des divers acides formés au cours de la fermentation.

En effet si, au début de la fermentation, les résultats étaient faciles à interpréter (mélange de deux acides, formique et acétique), il n'en était pas de même en fin de fermentation où apparaissaient de petites quantités d'un acide de poids moléculaire plus élevé.

Les techniques utilisées ont été les suivantes :

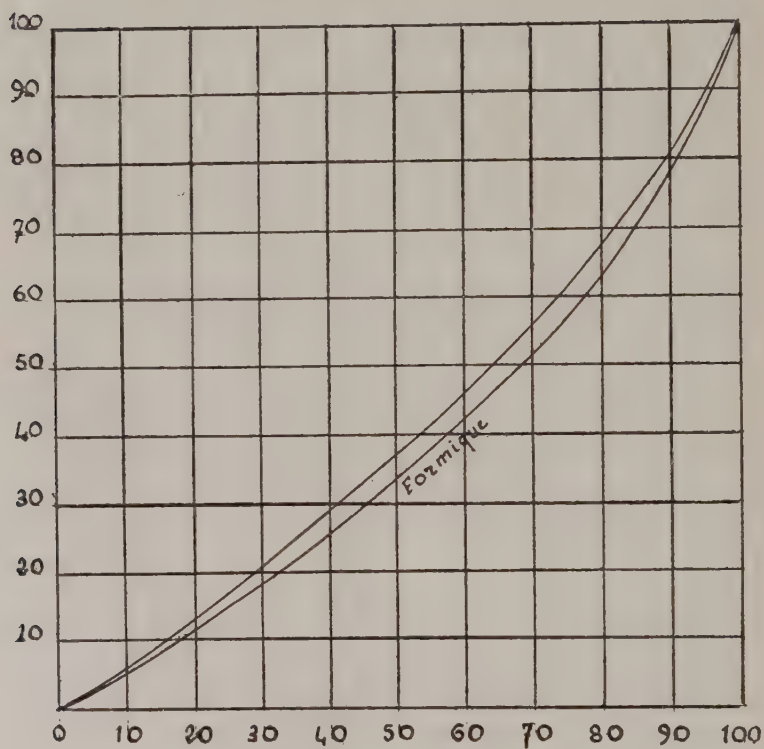
a) Pour les distillations en milieu sans carbonate de calcium distillation suivant la technique de DUCLAUX après avoir éliminé, s'il y avait lieu, les corps neutres volatils.

b) Pour les fermentations en présence de carbonate de calcium, on éliminait d'abord les corps neutres par distillation au tiers. On ramenait au volume primitif, on acidifiait par un léger excès d'acide tartrique; sur le liquide ainsi traité on appliquait la technique de DUCLAUX. Nous opposerons deux types de fermentation.

1^o FERMENTATION JEUNE (15 jours). — Un certain nombre de fermentations ont été analysées au bout de 10 à 15 jours. Les techniques classiques d'AGULHON permettaient d'y déceler l'acide formique et l'acide acétique.

D'autre part la distillation suivant la technique de DUCLAUX confirmait les résultats et permettait de préciser les proportions relatives des deux acides. Nous avons obtenu le tableau et la courbe suivante :

cm ³ distillés	cm ³ d'eau de chaux	p. 100	Proportion	
			acétique	formique
10	7,4	6,3	26,7	73,3
20	15,3	13,1	30	70
30	23,8	20,3	29,6	70,4
40	32,9	28,1	30,4	69,6
50	42,6	36,4	30,8	69,2
60	53,2	45,4	30,1	69,9
70	64,7	55,3	30,9	69,1
80	78	66,8	30,2	69,8
90	94,6	81	29,2	70,8
100	116,9	100		



La courbe est donc située entre celle de l'acide formique et celle de l'acide acétique. Nous avons appliqué, pour calculer la proportion des deux acides, la méthode classique : A chaque prise de 10 centimètres cubes recueillis correspond, sur la

courbe du mélange, un point qui partage l'intervalle $f a$ en deux segments dont le rapport est inversement proportionnel aux nombres de molécules des acides acétique et formique qui seraient distillées si l'on poussait la distillation jusqu'à 100 centimètres cubes.

Le rapport a été calculé pour les différentes prises de 10 en 10 centimètres cubes et a été trouvé à peu près constant, ce qui vérifie l'hypothèse d'un mélange de deux acides seulement.

La proportion moyenne serait de 30,8 p. 100 d'acide acétique et de 69,2 p. 100 d'acide formique, proportion correspondant au nombre de molécules distillant dans les 100 premiers centimètres cubes. Les tables de DUCLAUX permettent de calculer les proportions réelles dans la liqueur origine :

Acide formique	75,3 p. 100
Acide acétique	24,7 p. 100

2° FERMENTATION VIEILLIE (3 semaines). — Lorsqu'au contraire on analyse, au point de vue des acides acycliques, une fermentation qui touche à sa fin, alors que la cellulose est presque entièrement disparue, les résultats sont d'interprétation plus difficile. En effet, le tableau des prises partielles ne correspond plus à un mélange de deux acides. Il faut, pour l'interpréter, admettre l'existence d'une petite quantité d'un acide de poids moléculaire supérieur. Mais celui-ci se trouve être en trop petite quantité pour que nous ayons pu le déterminer chimiquement.

Cependant nous pensons, par la méthode suivante, pouvoir affirmer qu'il s'agit d'acide propionique ; nous avons également calculé ses proportions dans le mélange d'acides acycliques.

Nous avons fait tout d'abord une distillation de DUCLAUX dans le mélange complexe ; une première courbe a ainsi été obtenue. Dans une deuxième expérience nous avons opéré, avant la distillation de DUCLAUX, deux distillations successives ayant pour but d'enrichir le milieu en acides de poids moléculaire élevé. Une deuxième courbe a été ainsi obtenue. L'examen de ces deux courbes permet de calculer la nature et les proportions des trois acides. Enfin, dans un troisième temps, nous avons,

suivant la même technique, enrichi par deux distillations successives, le milieu en acides de poids moléculaire faible. Sur le liquide ainsi obtenu, une distillation de Duclaux a donné une troisième courbe. Celle-ci constituait une vérification en comparant les chiffres obtenus par l'expérience et ceux prévus par le calcul en admettant les proportions précédemment trouvées.

Voici le détail des expériences :

a) distillation de Duclaux sur le mélange des trois acides. Soit 110 centimètre cubes de la liqueur. Si je distille 100 centimètres cubes je recueille dans le distillat :

f molécules d'acide formique,
 a molécules d'acide acétique,
 p molécules d'acide propionique,
 quantités qu'il s'agit de déterminer.

La distillation de Duclaux donne le tableau suivant :

Cm ³ distillés	Eau de chaux	Proportions
10	8,1	6,3
20	17,2	13,4
30	26,9	20,9
40	37	28,8
50	47,6	37
60	59	45,9
70	71,5	55,6
80	85,3	67,2
90	104	88,8
100	128,7	100

Après avoir recueilli 50 centimètres cubes, par exemple, on a dans le distillat (d'après la deuxième table du Duclaux) :

$$0,344 f + 0,409 a + 0,568 p \text{ molécules d'acide.}$$

Comme dans les 100 premiers centimètres cubes il y a :

$$f + a + p \text{ molécules d'acides}$$

la proportion d'acides recueillis est : premier membre d'après les tables de Duclaux ; deuxième membre, expérimental) :

$$\frac{0,344 f + 0,409 a + 0,568 p}{f + a + p} = 0,37.$$

b) Distillation de Duclaux sur mélange enrichi en acides lourds.

Dans 110 centimètres cubes de la liqueur primitive il y a (Tableau I de Duclaux).

$$\frac{f}{0,59} + \frac{a}{0,80} + \frac{p}{0,95} \text{ molécules d'acide.}$$

Je prends ce volume de liquide, je distille et recueille les 67,5 premiers

centimètres cubes (1). J'étends à 110 avec de l'eau distillée, je redistille, et recueille à nouveau les 67,5 premiers centimètres cubes.

Ils contiennent (tableau I de DuCLAUx, par intrapolation) :

$$\frac{f}{0,59} \times \overline{0,30^2} + \frac{a}{0,80} \times \overline{0,465^2} + \frac{p}{0,95} \times \overline{0,705^2} \text{ molécules d'acides}$$

j'étends à 110 et fais une distillation de DuCLAUx :

Gm ³ distillés	Eau de chaux	Proportions
10	1,3	7,3
20	2,8	15,7
30	4,2	23,6
40	5,6	31,5
50	7,3	40,9
60	9	50,5
70	10,7	60,1
80	12,8	71,8
90	15,1	84,7
100	17,8	100

Dans les 100 premiers centimètres cubes, la première table de DuCLAUx indique comme quantité d'acides recueillis :

$$\frac{f}{0,59} \times \overline{0,30^2} \times 0,59 + \frac{a}{0,80} \times \overline{0,465^2} \times 0,80 + \frac{p}{0,95} \times \overline{0,705^2} \times 0,95.$$

C'est-à-dire en simplifiant :

$$f \, 0,09 + a \, 0,216 + p \, 0,497.$$

Dans les 50 premiers centimètres cubes (c'est le chiffre que je vais prendre pour le calcul) la deuxième table de DuCLAUx indique comme quantité d'acides recueillis :

$$f \times 0,09 \times 0,344 + a \times 0,216 \times 0,409 + p \times 0,497 \times 0,568.$$

Les proportions d'acides seront : premier membre d'après les tables de DuCLAUx, deuxième membre expérimental :

$$\frac{f \times 0,09 \times 0,344 + a \times 0,216 \times 0,409 + p \times 0,497 \times 0,568}{0,09 \times f + 0,216 \times a + 0,497 \times p} = 0,409.$$

Nous avons ainsi deux équations qui permettent de calculer des quantités proportionnelles à a , f , p .

Ces proportions, après résolution des équations, sont :

Acide formique	73,8 p. 100
Acide acétique	20,8 p. 100
Acide propionique	5,4 p. 100

distillant dans les 100 premiers centimètres cubes. Soit :

(1) En réalité nous avons opéré sur une plus grande quantité de liquide. Nous donnons ici les résultats pour 110 centimètres cubes afin de simplifier l'exposé.

Acide formique	79,8 p. 100
Acide acétique	46,6 p. 100
Acide propionique	3,6 p. 100

dans la liqueur primitive.

c) Distillation de DUCLAUX après enrichissement en acides légers.

Cette troisième expérience permet d'apporter une vérification aux résultats précédents :

1° Chiffres donnés par l'expérience.

Deux enrichissements successifs en acides légers (42 cm³ 5 restant après distillation de 67,3 pour 110 centimètres cubes) suivis d'une distillation de DUCLAUX donnent le tableau suivant :

Cm ³ distillés	Eau de chaux	Proportions
10	3,2	5,8
20	6,8	12,4
30	10,6	19,4
40	14,6	26,6
50	19,2	34,7
60	23,8	43,5
70	29,9	54,5
80	36,7	66,8
90	42	76,6
100	54,8	100

2° Chiffres prévus par le calcul.

Nous avons employé la même méthode de calcul que celle indiquée pour les enrichissements en acides lourds et avons obtenu la proportion théorique correspondant aux 50 premiers centimètres cubes de la distillation de DUCLAUX

$$\frac{f \times 0,49 \times 0,344 + a \times 0,286 \times 0,409 + p \times 0,087 \times 0,568}{0,49 \times f + 0,289 \times a + 0,0087 \times p}$$

La valeur numérique de cette expression, si l'on admet la proportion d'acides trouvés précédemment, est de 0,355.

D'autre part le tableau précédent indique comme proportion globale des acides distillés dans les 50 premiers centimètres cubes, le chiffre de 0,350.

La concordance suffisante des résultats prévus par le calcul et ceux donnés par l'expérience nous fait admettre comme valables, d'une part, la nature, d'autre part, les proportions, du mélange d'acides que nous proposons.

f) CORPS RÉDUCTEURS. — Nous avons déjà signalé l'absence de tout corps réducteur volatil. La présence de corps réducteurs non volatils a été recherchée par la liqueur cupro-potassique dans les quatre modalités de fermentation. On ne s'occupera ici que des fermentations en présence de carbonate de calcium

(la formation d'un corps réducteur en milieu sans carbonate de calcium sera étudiée au chapitre suivant).

En milieu neutre les résultats ont été entièrement négatifs. A aucun moment, jusqu'à disparition complète de la cellulose, il ne se forme de sucres réducteurs.

Il a déjà été montré, de plus, que les fibres attaquées ne cédaient à l'hydrolyse ménagée, acide ou alcaline, à 100° ou à froid, aucun corps réducteur (Il ne s'agit pas ici de l'hydrolyse énergique de la cellulose, mais de l'hydrolyse ménagée de corps intermédiaires qui auraient pu se former au niveau des fibres). Les mêmes essais ont été faits sur le liquide de fermentation après centrifugation. Ils ont également été négatifs.

Il est ainsi démontré que, au cours de la fermentation en milieu neutre ou alcalin, il ne se forme pas de sucres réducteurs, ni de corps, soit au niveau des fibres, soit en solution dans le milieu, susceptibles de donner par hydrolyse ménagée un sucre réducteur.

Donc, dans les conditions où nous avons opéré, nous n'avons pu mettre en évidence de corps intermédiaires. Tout se passe comme si la dégradation de la cellulose allait, d'emblée, jusqu'aux acides acycliques volatils avec formation de petites quantités d'alcool éthylique.

Nous avons noté, au cours de la fermentation, la formation de quelques bulles gazeuses, très peu nombreuses. Il ne nous a pas été possible de mesurer le volume des gaz ni de les caractériser.

Voici, à titre d'exemple, un bilan de fermentation :

	En poids	En carbone
Poids de la cellulose mise en fermentation.	6 g. 50	2 g. 6
Poids de la cellulose disparue	5 g. 75	2 g. 3
Rendement	88,5 p. 100	
Acides acycliques volatils :		
Formique	3 g. 66	0 g. 95
Acétique	0 g. 99	0 g. 39
Propionique	0 g. 27	0 g. 13
Total	4 g. 92	1 g. 47
Rendement :		
p. 100 de cellulose en fermentation	75,5 p. 100	56,5 p. 100
— disparue	85,5 p. 100	63,8 p. 100
Alcool (en alcool éthylique)	1 g. 18	0 g. 616

Rendement :

p. 100 de cellulose en fermentation . . .	18,2 p. 100	23,7 p. 100
— disparue	20,5 p. 100	26,8 p. 100

Rendement total :

p. 100 de carbone en fermentation	80,3 p. 100
— disparu	90,6 p. 100

PARALLÈLE ENTRE LA FERMENTATION « IN VIVO » ET « IN VITRO ». —
 Sous réserve des faits signalés au début de ce chapitre, en liaison avec la variabilité de la fermentation *in vivo*, les analyses précédentes permettent d'établir un parallélisme étroit entre les deux fermentations.

Toutes deux, en milieu alcalin, aboutissent à la dégradation complète de la cellulose avec formation d'acides acycliques et d'un peu d'alcool. Les différences les plus importantes consistent en la formation, dans la panse d'acides de poids moléculaire plus élevé et surtout de gaz en quantité assez importante. Mais il nous paraît difficile de dire jusqu'à quel point les fermentations secondaires ne sont pas à l'origine de ces gaz dont nous avons vu la variabilité avec l'alimentation.

Ce parallélisme sera un argument de plus pour attribuer à *Pl. cellulolyticum* de l'importance dans la biologie de la panse et dans le mécanisme de la digestion et de la nutrition des Ruminants.

CHAPITRE III

FORMATION DE SUCRES RÉDUCTEURS *IN VITRO*. CELLULASE

Nous avons cherché à mettre en évidence, par divers procédés, la formation de sucres réducteurs dans le milieu de fermentation, sous l'influence d'une diastase.

Nous avons d'abord employé les méthodes classiques de PRINGSHEIM en arrêtant la culture, au maximum de la fermentation, par un antiseptique volatil. Dans ces conditions le liquide devient réducteur. Mais il est bien évident qu'un pareil mécanisme (arrêt des cultures par un antiseptique), ne peut être évoqué pour expliquer la formation éventuelle de sucres réducteurs dans le tube digestif des Ruminants.

Nous avons ensuite montré qu'un changement de réaction du milieu de fermentation (passage d'un pH alcalin à un pH acide) permettait de faire apparaître un sucre réducteur dont l'origine n'est pas liée au seul changement de réaction du milieu.

I. — MISE EN ÉVIDENCE D'UNE CELLULASE

Nous avons employé la technique classique de PRINGSHEIM. Plusieurs essais ont été faits pour déterminer le meilleur antiseptique à employer.

Le premier essai a été celui préconisé par PRINGSHEIM : une solution d'iodoforme à 1 p. 100 dans l'acétone ; cette solution était ajoutée au milieu de fermentation dans la proportion de 4 p. 100. Mais nous nous sommes aperçus d'un inconvénient de cette méthode : on sait que l'antiseptique employé ne doit pas

être réducteur, puisque l'apparition d'un pouvoir réducteur dans le milieu de fermentation (traduisant la formation de glucose), est le test de l'existence d'une cellulase. Or nous avons vu que la solution devient spontanément et très rapidement réductrice, même conservée en flacons émeris pleins et à l'obscurité. En même temps le liquide prend une teinte brune et laisse dégager des vapeurs très irritantes. Cette réaction est amorcée moins de 12 heures après la préparation de la solution. Il faudrait donc, pour être certain de la méthode, n'employer que des solutions préparées immédiatement avant l'emploi.

C'est finalement le toluène que nous avons utilisé, après nous être assuré, par de nombreuses expériences témoins, de l'absence de causes d'erreurs dans la technique.

La fermentation était faite à 37° dans des ballons de 3 litres, fermés au coton et capuchonnés de caoutchouc. Le milieu utilisé était le milieu semi-synthétique additionné de carbonate de calcium. Au maximum de la fermentation (une douzaine de jours) on ajoutait du toluène en quantité suffisante pour qu'une couche de 2 millimètres environ recouvrit entièrement la surface du milieu. Puis le ballon était très vigoureusement agité pendant plusieurs minutes. Le contenu prenait alors un aspect laiteux et une très fine couche de toluène en excès en recouvrait encore la surface. Chaque jour les ballons, remis à 37°, étaient ainsi agités et une prise d'essai était faite aseptiquement pour rechercher l'apparition du pouvoir réducteur. Celui-ci se manifeste vers le cinquième jour, environ, puis va en augmentant (1).

Au moment où la quantité de sucre réducteur nous a semblé ne plus augmenter (quinze jours environ après l'adjonction de toluène) nous avons titré la quantité de sucres réducteurs formés dans le milieu avec la liqueur cupro-potassique (technique de G. BERTRAND). Les résultats, pour trois expériences faites à partir de 5 grammes de cellulose, donnaient les chiffres de

(1) Les expériences « témoin » réalisées ont été les suivantes :

Toutes autres conditions égales, le toluène était ajouté à un ballon non ensemencé. Résultat négatif.

Toutes autres conditions égales, le toluène était ajouté à un ballon après stérilisation de la fermentation à 120° pendant une demi-heure. Résultat négatif.

0 g. 4, 0 g. 35, 0 g. 5 de corps réducteurs exprimés en glucose.

Nous avons remarqué que les chiffres trouvés étaient d'autant plus forts que l'apparition du pouvoir réducteur avait été plus précoce après l'adjonction de toluène. Cette constatation concorde avec les faits signalés par PRINGSHEIM : le taux des corps réducteurs formés est fonction de la rapidité d'action de l'antiseptique.

Nous avons ensuite cherché à caractériser les sucres réducteurs formés en préparant leurs osazones. Six litres de liquide de fermentation traités par le toluène ont été concentrés à 200 centimètres cubes par ébullition sous pression réduite, à 65° environ.

Une première défécation était obtenue par adjonction de quatre volumes d'alcool à 95°. Le précipité était éliminé par filtration. Nouvelle concentration, dans les mêmes conditions à 30 centimètres cubes (nous avons alors constaté que cette défécation par l'alcool était insuffisante ; l'osazone était incristallisable). Une deuxième défécation a été faite par le sous-acétate de plomb. Celui-ci était ajouté progressivement jusqu'à ce qu'il ne produise plus de précipité. Le léger excès de plomb était éliminé par du sulfate de sodium versé goutte à goutte.

C'est sur la liqueur ainsi traitée que nous avons fait agir du chlorhydrate de phényl-hydrazine en présence d'acétate de sodium.

On a ainsi obtenu une osazone insoluble à froid et à chaud dans l'eau, insoluble dans l'alcool méthylique. Elle a été purifiée par lavage à l'eau et l'alcool méthylique, par solution dans l'alcool éthylique bouillant et recristallisation (deux fois). Le point de fusion instantanée, pris au bloc MAQUENNE, était de 229°, donc très sensiblement celui de la glucosazone (230°).

Une deuxième osazone, également obtenue, était soluble dans l'eau bouillante ; mais nous n'avons pu l'avoir qu'en quantité trop faible pour pouvoir la caractériser (le matériel dont nous disposions ne nous permettait pas d'opérer sur un assez grand volume de culture). Néanmoins il est permis de supposer, par analogie avec les résultats obtenus par PRINGSHEIM, qu'il s'agissait de cellobiosazone.

Il se forme donc, dans les fermentations arrêtées par le toluène, du glucose et vraisemblablement de petites quantités de cellobiose; *Pl. cellulolyticum* sécrète une cellobiase et une cellulase.

II. — MODIFICATIONS DU MÉTABOLISME DE LA FERMENTATION SOUS L'INFLUENCE D'UN CHANGEMENT DE pH

De cette première série d'expériences nous avons conclu que la souche bactérienne isolée du contenu de la panse de bœuf sécrétait une cellulase et une cellobiase. On pouvait donc admettre la formation, à un moment donné, dans le tube digestif des Ruminants, de glucose et de cellobiose, c'est-à-dire d'un élément énergétique directement assimilable. Mais il fallait mettre en évidence un mécanisme autre que celui réalisé au laboratoire, *in vitro*, au moyen d'antiseptiques.

Nous avons cherché, pour élucider ce problème, à nous rendre compte de ce qui peut se passer lorsque le contenu de la panse passe dans la caillette, c'est-à-dire, chimiquement parlant, lorsque la fermentation amorcée en milieu alcalin est continuée en milieu acide.

Sachant que, au cours d'une fermentation sans carbonate de calcium, la réaction devient rapidement acide par formation d'acides acycliques volatils, nous avons abandonné à elle-même une telle fermentation. Dans ces conditions, assez rapidement, l'attaque de la cellulose s'arrête et il reste une quantité assez appréciable de fibres au fond du ballon. Nous avons alors cherché régulièrement, par des prises d'essai faites aseptiquement, l'apparition d'un pouvoir réducteur. Celui-ci s'est manifesté après 15 jours environ, donc après un délai très long. A ce moment le pH du milieu était de 5,2. Nous avons dosé, par la technique précédemment indiquée, le pouvoir réducteur au moment où il n'augmentait plus. A partir de 7 grammes de cellulose mise en fermentation il s'était formé 0 g. 3 de sucres réducteurs, exprimés en glucose, quantité très minime qui nous semble être en rapport avec la lenteur d'apparition du pouvoir réducteur, suivant la loi mise en évidence lors des expériences utilisant les antiseptiques volatils.

Dans un deuxième temps nous avons cherché à nous rapprocher, plus encore, des conditions de digestion dans la caillette et à nous rendre compte, de façon plus précise, du facteur pH dans le métabolisme de la fermentation.

Une culture est réalisée en milieu sans carbonate de calcium, dans une série de dix tubes (25 centimètres cubes). Les tubes sontensemencés le même jour avec le même volume de culture mère. Au moment où l'attaque de la cellulose semble sur son déclin (10 jours) le pH est égal à 5,2. On ajoute alors soit de la soude, soit de l'acide chlorhydrique normal, avec une pipette donnant XX gouttes au centimètre cube, selon les doses indiquées dans le tableau suivant :

Tubes		pH final	Glucose
—		—	—
1	XV NaOH N		0
2	X —		0
3	V —	5,2	+
4	I HCl N	4,8	++
5	II —	4,4	+
6	III —		0
7	V —		0
8	VII —		0
9	X —		0
10	XV —		0

puis ces tubes sont capuchonnés de caoutchouc et remis à l'étuve à 37°. Quinze jours après le contenu des tubes est centrifugé, le pH est mesuré ; puis on neutralise avec de la soude ou de l'acide chlorhydrique, suivant les tubes, et l'on y recherche un pouvoir réducteur. Les résultats indiqués sur le tableau montrent une certaine quantité de sucre dans les tubes 3, 4, 5 avec un maximum dans le tube 4, c'est-à-dire dans les tubes présentant un pH égal à 5,2-4,8 ou 4,4 (dans le tube 3 où avaient été mises V gouttes de solution normale de soude la fermentation bactérienne continue ; les acides acycliques formés ont saturé la soude puis ont rendu le milieu acide).

Nous avons interprété ainsi les résultats : en milieu alcalin il y a formation d'acides acycliques volatils. Au contraire, entre pH = 5,2 et pH = 4,4 la culture est arrêtée et la diastase peut agir sur la cellulose pour former du glucose. Au-dessous

de $\text{pH} = 4,4$ la diastase est vraisemblablement incapable d'agir sur la cellulose.

Dans une deuxième expérience, nous plaçant dans les conditions optima indiquées par l'essai précédent, nous avons mesuré quantitativement le pouvoir réducteur. A partir de 5 grammes de cellulose dans 500 centimètres cubes de culture dans laquelle il a été ajouté, comme il a été décrit, 1 centimètre cube d'acide chlorhydrique normal, il a été obtenu 0 g. 50 de corps réducteurs non volatils exprimés en glucose (1). Le rendement est sensiblement le même qu'en ajoutant le toluène comme antiseptique.

Cependant nous avons voulu nous assurer que le corps réducteur formé n'était pas le produit d'une hydrolyse acide d'un dérivé hypothétique de la cellulose. Ce mécanisme était d'ailleurs peu vraisemblable puisque nous avons antérieurement montré que les essais d'hydrolyse ménagée, acide ou alcaline, à chaud ou à froid, des fibres attaquées étaient négatifs. Cependant l'expérience suivante a été réalisée : toutes autres conditions égales, un tube analogue au tube 4 de l'expérience précédente est stérilisé par chauffage à 120° pendant 15 minutes puis on ajoute 1 goutte d'acide chlorhydrique normal et on laisse à l'étuve pendant le même temps. Le pouvoir réducteur n'apparaît pas : la diastase a été détruite par le chauffage et la seule réaction acide du milieu ne suffit pas pour former du glucose à partir de la cellulose attaquée.

On peut résumer ainsi, du point de vue chimique, les faits observés.

Pl. cellulolyticum, en milieu alcalin, fait fermenter la cellulose en donnant des acides acycliques volatils : ac. formique, ac. acétique, plus de petites quantités d'ac. propionique et d'alcool éthylique, à l'exclusion de tout sucre réducteur. Lorsqu'il est mis dans des conditions telles que le germe ne peut plus végéter, des diastases transforment la cellulose en glucose et en cellobiose (la présence de ce dernier corps n'ayant pas, cependant, été établie de façon certaine). Pour obtenir ce

(1) Nous avons pu obtenir, à partir de ce corps réducteur, une ozazone, cristallisant comme la glucozazone, insoluble dans l'eau bouillante, insoluble dans l'alcool méthylique. Les quantités obtenues étaient trop minimes pour pouvoir mesurer son point de fusion.

résultat on peut employer, entre autre, soit des antiseptiques (toluène), soit un changement de réaction du milieu : pH entre 5,2 et 4,4. La diastase peut agir entre $\text{pH} = 7$ et $\text{pH} = 4,4$. D'ailleurs si la limite inférieure de pH a été fixée, la limite supérieure ne l'a pas été par nos expériences. Le rendement de la fermentation, en milieu alcalin, est excellent, la cellulose est entièrement détruite ; 90,6 p. 100 du poids de la cellulose (en carbone) est retrouvé.

Le rendement, en milieu acide, est toujours faible. Il n'a jamais été trouvé supérieur à 10 p. 100. Ce rendement est d'autant plus élevé que l'apparition du glucose est plus précoce, c'est-à-dire que les modifications du milieu ont agi plus vite sur la bactérie. Il est d'ailleurs remarquable que les spores résistent à l'acidité et que, même après un mois, une « culture fille » peut être obtenue si l'on a soin d'ensemencer avec un grand volume.

CHAPITRE IV

ROLE DE *PL. CELLULOLYTICUM* DANS LA DIGESTION DE LA CELLULOSE CHEZ LES RUMINANTS

Des faits bactériologiques et biochimiques décrits dans les chapitres précédents il nous semble pouvoir tirer quelques conclusions concernant la digestion de la cellulose et la nutrition des Ruminants.

A) NATURE ET ORIGINE DE LA FLORE DE LA PANSE. — Tout d'abord une symbiose de germes, au sens strict du mot n'est pas nécessaire pour fermenter la cellulose. Une Bactérie, en culture pure, isolée de la panse, permet d'obtenir la cellulolyse *in vitro* à un taux très élevé, pratiquement de 100 p. 100.

Il est bien certain que, s'il est plus facile de réaliser la cellulolyse en culture impure qu'en culture pure, c'est que les germes cellulolytiques sont très exigeants au point de vue de la nature des sources d'azote qui leur sont fournies. Le travail de Y. KHOUVINE, et le nôtre, en sont la démonstration. Les germes associés n'agissent probablement qu'en amenant au degré de dégradation favorable les protides des milieux de culture utilisés. (On pourrait d'ailleurs admettre, à côté de ces facteurs chimiques de croissance l'existence d'autres facteurs, « facteurs activants », agissant à faibles doses dont la nécessité est si fréquente pour la culture des Bactéries et même des Infusoires parasites).

Il est vrai que, pratiquement, nous ne pouvons nous en passer puisque, pour obtenir une cellulolyse, nous devons obligatoirement utiliser soit ces germes associés, soit leurs produits de métabolisme. Si l'on tient à garder le mot de

symbiose il faut l'employer dans un sens très large : la dégradation de la cellulose ne peut être réalisée dans le tube digestif des Ruminants que dans certaines conditions biochimiques ; ces conditions biochimiques sont réalisées par des Bactéries saprophytes.

La Bactérie que nous avons isolée paraît être constante dans le contenu de la panse de bœuf. Cinq essais faits sur cinq panses différentes nous ont toujours donné le même germe. Elle a également été trouvée une fois dans la panse de mouton. Cela ne veut d'ailleurs pas dire que ce soit la seule Bactérie effectivement cellulolytique contenue dans la panse.

Cependant il semble indispensable d'insister ici sur l'opposition très nette entre deux techniques générales d'expérimentation. Un certain nombre de travailleurs, HOPPE, KHOUVINE, nous-même, cherchant à isoler des Bactéries cellulolytiques du tube digestif de l'homme ou des animaux ont cherché à réaliser, dans les milieux de culture, des conditions aussi semblables que possible à celles de leur milieu naturel très spécial. Dans le cas présent de ce travail cela nous permet d'affirmer que *Pl. cellulolyticum* est effectivement cellulolytique dans la panse.

Est-il permis de tirer les mêmes conclusions des travaux de ELLENBERGER, ARNAUDI, WOODMAN (ce dernier se fait d'ailleurs à lui-même cette objection) ? Nous ne le pensons pas. *Aspergillus cellulosa* a été isolé par ELLENBERGER en aérobiose, sans azote aminé ; *Cytophaga* et *Cellvibrio* par ARNAUDI, sur plaque au silico-gel sans azote aminé non plus, c'est-à-dire dans des conditions très artificielles par rapport à celles de la panse ; c'est un thermophile que WOODMAN a isolé ; il n'est cellulolytique qu'à 60°.

On comprendra d'autant plus nos réserves si l'on remarque que les milieux utilisés par ces auteurs sont justement ceux favorables aux Bactéries du sol, réalisant le plus exactement possible le milieu « sol ». Or, il semble logique, *a priori*, d'admettre que les Ruminants s'infestent en broutant les foin, les herbes souillées de terre, dans les prés, en d'autres termes qu'ils s'infestent avec les Bactéries cellulolytiques du sol. Ce sont justement les germes retrouvés par ELLENBERGER, ARNAUDI et WOODMAN dans le contenu de la panse. Ils ont conservé

leurs caractères biologiques de microbe du sol ; ces caractères ne leur permettent pas d'exercer leur pouvoir cellulolytique dans la panse.

Au contraire, *Pl. cellulolyticum* était, à son isolement, parfaitement adapté à être cellulolytique dans la panse (comme *B. cellulosa dissolvens* à l'être dans le tube digestif de l'homme) ; par contre, il était inreconnaissable comme germe du sol et il n'y eût effectivement pas été cellulolytique.

Or, après dix-huit mois de culture et un entraînement progressif il a acquis (ou récupéré), justement, les caractères biologiques d'un germe du sol. Nous pensons que le phénomène observé *in vitro* est l'inverse de celui qui se passe dans la nature lors de l'ingestion des Bactéries par les Ruminants (Le phénomène observé doit d'ailleurs être réalisé également dans la nature lors de l'émission des matières fécales et du retour des germes au milieu extérieur). Dans ces conditions il paraît logique d'émettre, comme interprétation d'ensemble de la flore de la panse, l'hypothèse suivante :

Pl. cellulolyticum serait un germe du sol qui se serait secondairement adapté au milieu de la panse (Il aurait, d'ailleurs, suivi les règles générales du parasitisme : exaltation de la fonction biologique qui est, dans chaque cas particulier, à la base du parasitisme ; affaiblissement ou disparition des autres fonctions qui ne sont plus nécessaires à la vie). *Pl. cellulolyticum* offre un exemple de la perte d'un pouvoir de synthèse : vivant dans un milieu spécial où l'azote lui était fourni sous une forme complexe il a perdu le pouvoir de synthèse de ses protides protoplasmiques à partir de l'azote ammoniacal. Si l'on en croit la loi de PENFOLD, sur les phénomènes de variation microbienne, la perte de ce pouvoir de synthèse devait être fort ancienne car le germe a mis longtemps pour la récupérer.

Pl. cellulolyticum serait « la » ou tout au moins « une » Bactérie effectivement cellulolytique de la panse, physiologiquement utile aux Ruminants.

On pourrait ainsi opposer deux types de germes cellulolytiques dans la panse : d'une part, des germes « de passage » qui ne font que traverser le tractus digestif et n'y jouent aucun rôle effectif dans la digestion ; d'autre part, des germes

spéciaux, dont *Pl. cellulolyticum* est le type, germes du sol adaptés à leur nouveau milieu, véritables « Bactéries digestives » des Ruminants.

2° MÉCANISME DE LA DIGESTION DE LA CELLULOSE ET DE LA NUTRITION DES RUMINANTS. — Nous rappelons que lorsque la fermentation amorcée en milieu alcalin est continuée en milieu acide, ce sont des sucres réducteurs qui sont formés. L'intérêt du fait est que l'on était logiquement obligé d'admettre cette transformation de la cellulose en sucres assimilables, énergétiques, pour expliquer la nutrition des Ruminants.

En effet, si nous transposons les faits observés *in vitro* en ce qu'ils signifient *in vivo* le mécanisme de la digestion de la cellulose peut être ainsi interprété :

La fermentation est amorcée dans la panse en milieu alcalin. En dehors de son rôle mécanique la panse apparaîtrait comme une simple « étuve » qui permettrait la prolifération des germes cellulolytiques. Elle n'exerce par contre aucune action de « prédigestion » sur la cellulose ; au contraire, la portion de cellulose qui y est détruite est perdue pour le Ruminant. Lors du passage du contenu de la panse, propulsé par le bonnet, finement divisé par le feuillet, dans la caillette, la fermentation est amenée à un pH acide, en présence d'acide chlorhydrique ; les acides acycliques formés dans la panse et saturés par des bases sont également mis en liberté et leur fonction acide s'ajoute à celle de l'acide chlorhydrique. A ce moment la prolifération des germes cellulolytiques est arrêtée ; seules les spores résistent ; la cellulase transforme la cellulose en glucose ; celui-ci est directement absorbable, assimilable et énergétique. Il va sans dire que des vérifications, sur l'animal, seront à faire.

CHAPITRE V

ESSAIS SUR LE ROLE DES INFUSOIRES DANS LA DIGESTION DE LA CELLULOSE

Nous avons utilisé la méthode, déjà signalée au début de ce travail, qui consiste à essayer la culture des Infusoires en présence de cellulose.

Pour arriver à ce résultat il semblait qu'un milieu aussi semblable que possible à celui de la panse, fut le meilleur. Nous pensions que les cultures bactériennes que nous avions réalisées répondraient à cette condition : elles contiennent en effet tous les éléments du liquide de panse, de la cellulose, des corps bactériens ; elles ont le même pH et le même rH que la panse.

Les expériences suivantes ont été réalisées : des échantillons de contenu de panse, prélevés aux abattoirs immédiatement après que le Ruminant fut abattu, étaient conservés à 37° dans des bouteilles thermos, et rapportés, aussi rapidement que possible, au laboratoire. Les Infusoires, prélevés à la pipette, étaient passés plusieurs fois de suite dans de petites quantités de liquide de panse stérile, à 37°. Les expériences ont porté sur *Entodinium* et *Diplodinium* (Ophryoscolecids) et sur *Isotricha* et *Dasytricha* (Isotrichids). Puis, ces Infusoires ont étéensemencés dans les milieux qui vont être énumérés. A chaque fois une dizaine d'Infusoires, environ, étaient répartis dans 1 centimètre cube et demi de milieu. Les tubes de culture étaient conservés à l'étuve, à 38° et à l'obscurité.

Les milieux utilisés ont été les suivants :

1° Milieu « panse-cellulose » tel qu'il a été décrit. Il n'y a jamais été observé de survie de plus de 24 heures. Une culture de Bactéries saprophytes était le plus souvent observée ; rare-

ment une cellulolyse en raison du trop petit nombre de Bactéries cellulolytiques ensemencées avec les Infusoires lavés.

2° Milieu « panse-cellulose » où la cellulose était fournie sous forme précipitée (à partir de solution dans le liquide au chlorure de zinc).

3° Les deux milieux précédents, ensemencés, soit simultanément avec les Infusoires et *Pl. cellulolyticum*, soit avec la Bactérie d'abord, puis avec les Infusoires huit jours après (donc milieu en pleine fermentation).

Dans tous ces essais la survie des Infusoires n'a jamais dépassé 48 heures. Les formes les plus résistantes étaient *Endodinium* et, surtout, *Isotricha*.

Pensant que la stérilisation par la chaleur altérerait les constituants du milieu de culture et, surtout, pouvait détruire des substances activantes, nous avons réalisé les mêmes expériences avec du liquide de panse qui avait été stérilisé par filtration sur bougie Berckfeld. Les résultats ont, cependant, été également négatifs.

Nous avons enfin essayé, suivant la technique préconisée par RATECLIFFE H. pour la culture de certains protistes parasites de l'intestin, d'ajouter au milieu de culture de la mucine gastrique ou intestinale. La survie constatée n'a pas été plus longue.

Il est difficile de tirer des conclusions de ces résultats négatifs puisque la survie observée est de l'ordre de grandeur de celle des Infusoires laissés dans leur milieu, à 37°. Comme il a été montré, par d'autres méthodes, que les Infusoires de la panse étaient capables de digérer la cellulose, il faut penser que des facteurs d'un ordre particulier, et qui n'ont pu encore être réalisés *in vitro*, sont indispensables à leur culture.

ADDENDUM

La rédaction de cette thèse était terminée quand nous avons eu connaissance du travail de ALB. WESTPHAL (*Zeits. für Parasitenkunde*, 1934, VII, p. 71).

Cet auteur est parvenu à conserver du contenu de panse, *in vitro*, sans altération ; les infusoires, en particulier, y ont été maintenus vivants et s'y sont multipliés. L'auteur conclut, du point de vue qui nous intéresse, que la biologie des infusoires est intimement liée à celle de la fermentation bactérienne de la panse ; qu'ils sont incapables de digérer par eux-mêmes la cellulose ; qu'ils utilisent, par contre, pour leur nourriture, l'amidon, les bactéries de la panse, les glucides solubles ; que ce sont, pour les Ruminants, de simples commensaux.

CONCLUSIONS

La biologie de la panse des Ruminants pose de multiples problèmes. Nous avons cherché à élucider celui de la digestion de la cellulose. Nos premiers essais furent d'ordre protistologique ; ils aboutirent rapidement à une impasse. La bibliographie de la question montrait par ailleurs les multiples insuccès des auteurs qui avaient suivi la voie protistologique et, au contraire, la très grande importance des phénomènes d'ordre bactérien. C'est, par la suite, la voie bactériologique que nous avons suivie.

Il s'agissait de savoir si une symbiose de germes était nécessaire pour réaliser la fermentation de la cellulose, ou si une espèce bactérienne, à elle seule, en était capable. Il s'agissait en outre de rechercher sous quelle forme les produits de dégradation de la cellulose pouvaient être absorbés dans le tube digestif et quel pouvait être le mécanisme de formation de ces produits de dégradation.

1° Six souches bactériennes ont été isolées en culture pure : cinq à partir du contenu de la panse de bœuf, une à partir de celle du mouton ; ces six souches se sont montrées identiques et l'espèce ainsi mise en évidence était différente de celles antérieurement décrites. L'isolement et la culture n'ont été réalisables que dans un milieu aussi semblable que possible à celui de la panse, à l'exclusion de tout autre : il était constitué par du liquide de contenu de panse étendu d'eau ; la cellulose était adjointe sous forme de papier à filtrer ; le pH était maintenu constant, à 8 environ, par du carbonate de calcium ; la culture était faite en anaérobiose, sous l'huile de vaseline.

2° Le milieu a étéensemencé avec le contenu de la panse et enrichi en bactéries cellulolytiques sporulées par chauffage à 80° lors de chaque repiquage. La culture pure a été obtenue ensuite par repiquage en milieu liquide d'une colonie unique obtenue sur gélose de VEILLON additionnée de liquide de panse.

La souche a été conservée dans le milieu liquide, décrit ci-dessus, par repiquages en série linéaire et continue, pendant deux ans.

3° *Plectridium cellulolyticum* (n. sp.) est un bâtonnet mobile, cilié, se colorant par la méthode de GRAM, à spore terminale (microspore et macrospore). Il est thermorésistant et se cultive à la température optima de 40°. Ce n'est pas un thermophile. Il est anaérobie facultatif, mais n'est cellulolytique qu'en anaérobiose. Il fait fermenter divers sucres et alcools en aérobiose et anaérobiose. Il ne fait fermenter ni l'amidon ni l'inuline. Il est peptidolytique mais non protéidolytique. Il n'est pas pathogène pour la souris et le lapin.

4° Une symbiose de germes n'est donc pas nécessaire pour réaliser la fermentation de la cellulose, *in vitro*, à partir du contenu de la panse, mais il est nécessaire d'utiliser un milieu favorable ; celui-ci n'a pu être réalisé que par dilution du contenu même de la panse, maintenu aux mêmes pH et rH. On peut supposer que ce milieu contient des produits de dégradation des protides, au stade voulu, ou bien des substances actives dont ne peut se passer *Pl. cellulolyticum*. Les bactéries saprophytes, auxquelles on pensait attribuer un rôle symbiotique, agiraient, dans la panse, en réalisant cette dégradation ménagée des protides.

5° Nous avons assisté, au cours de la conservation de cette souche, *in vitro*, repiquée en série linéaire et continue pendant deux ans, à la modification des facteurs nécessaires à la cellulolyse ; nous avons noté l'augmentation limitée de son pouvoir de synthèse. La cellulolyse a d'abord été possible en aérobiose et en milieu sans carbonate de calcium. Puis *Pl. cellulolyticum* s'est contenté de sources azotées de plus en plus simples. Alors que, au moment de son isolement, il poussait exclusivement sur un milieu contenant une substance azotée complexe, associée vraisemblablement à des substances activantes, nous avons pu par la suite et progressivement, le cultiver sur milieu contenant comme seule source d'azote une substance azotée complexe seule, puis des sels organiques d'ammonium ; enfin des sels minéraux d'ammonium, la source de carbone restant toujours de la cellulose. Dans ces conditions la souche a déjà pu être conservée pendant neuf passages successifs. Le taux de

cellulolyse y est de l'ordre de 50 p. 100. Nous n'avons jamais pu mettre en évidence de pouvoir dénitrifiant.

6° Nous pensons pouvoir interpréter ces faits en admettant qu'il s'agit de la récupération d'un pouvoir de synthèse ancien. *Pl. cellulolyticum* serait primitivement une bactérie cellulolytique du sol à pouvoir de synthèse élevé. Transporté dans le milieu « panse », devenant parasite, il y perdrait en partie son pouvoir de synthèse (ou tout au moins celui-ci ne serait plus qu'à l'état latent) et, remis à nouveau dans des milieux artificiels, le récupérerait progressivement, tout au moins en partie.

7° La flore bactérienne cellulolytique de la panse serait constituée, d'une part, par des germes, type *Pl. cellulolyticum*, effectivement cellulolytiques dans les conditions qui y sont réalisées (anciens germes du sol, adaptés), d'autre part, par des germes, cellulolytiques dans certaines conditions, mais qui, de par leurs caractères biologiques, ne peuvent l'être dans la panse (germes du sol, non adaptés).

8° Au cours de la fermentation de la cellulose par *Pl. cellulolyticum*, en milieu alcalin, nous avons pu mettre en évidence la formation d'acides acycliques volatils : acide formique, acide acétique et, en fin de fermentation, acide propionique en petites quantités ; de l'alcool éthylique et des gaz en quantités très minimes non caractérisés. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la formation d'autres corps intermédiaires, en particulier de corps réducteurs. Le taux de la cellulolyse est voisin de 100 p. 100. Le carbone retrouvé dans ces divers corps énumérés correspond à 90,6 p. 100 de celui de la cellulose disparue. Le métabolisme de cette fermentation, *in vitro*, présente de très grandes analogies avec celui de la fermentation, *in vivo*, dans la panse.

9° En traitant la culture, au moment du maximum de fermentation, par le toluène, il se forme du glucose (caractérisé par son osazone) et de petites quantités d'un autre sucre, vraisemblablement du cellobiose. Le glucose ainsi formé représente 10 p. 100 du poids de la cellulose mise en fermentation.

10° En faisant se poursuivre en milieu acide la fermentation amorcée en milieu alcalin il se forme un corps réducteur, non volatil, à osazone insoluble à chaud et dans l'alcool méthylique, qui, exprimé en glucose, représente 10 p. 100 du poids

de la cellulose mise en fermentation. Le mécanisme de la formation de ce glucose est différent de celui d'une hydrolyse acide; nous le considérons comme diastasique. En milieu acide (entre $\text{pH} = 5,2$ et $\text{pH} = 4,4$) la culture est arrêtée et la diastase bactérienne transforme la cellulose en glucose. Cette cellulase peut donc agir en milieu acide et en milieu neutre (culture arrêtée par le toluène).

11° Nous pensons pouvoir interpréter ainsi le mécanisme de la digestion de la cellulose (en attendant des vérifications sur l'animal) : la fermentation est amorcée, en milieu alcalin, dans la panse, celle-ci permettant la prolifération des germes cellulolytiques. Lors du passage du contenu de la panse dans la caillette, en milieu acide, la cellulase bactérienne transforme la cellulose en glucose. Ainsi se trouverait expliquée la valeur énergétique de la cellulose que la seule transformation de celle-ci en acides acycliques ne saurait permettre de comprendre.

BIBLIOGRAPHIE

- ANKERSCHMIT. — Untersuchungen über die Bakterien im Verdauungskanal des Rindes. *Centralbl. f. Bakt., Orig.*, 1905, t. 39, p. 359; 1906, t. 40, p. 400.
- ARNAUDI (Ch.) — La présence dans le rumen des bovidés de microorganismes dégradant la cellulose, du groupe *Cytophaga*. *Boll. Sez. It. Soc. Intern. di Microbiologia*, 1931.
- ARNAUDI (Ch.) et JARACH (M.). — Recherche sur la micro-flore de la bruyère de Lombardie. *Boll. Sez. It. Soc. Intern. di Microbiologia*, 1930, n° 9.
- BECKER. — Methods of rendering the rumen and reticulum of Ruminants free from their normal infusorian fauna. *Proc. Nat. Acad. Sci. Washington*, 1929, t. 15.
- BECKER. — Progress report on weight increases in lambs with and without rumen infusoria. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1929, t. 15, p. 684.
- BECKER. — The present status of problems relating to the ciliates of Ruminants and Equidæ. *Quart. Review of Biol.*, t. 8, 1932, p. 282.
- BECKER and EVERETT. — Comparative growths of normal and infusorian-free lambs. *Amer. Journ. Hyg. Baltimore*, 1930, t. 11.
- BECKER and FRYE. — Some protozoa found in the faeces of cattle. *Proc. Iowa Acad. Sci., Des Moines*, 1927, t. 34.
- BECKER-HSIUNG. — The methods by which ruminants acquire their fauna of infusoria, and remarks concerning experiments on the host-specificity of these protozoa. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1929, t. 15, p. 684.
- BECKER and SCHULZ. — Some studies on the biology of the infusoria of the Ruminants stomach. *J. Parasit. Urbana*, 1929, t. 16.
- BECKER, SCHULZ, EMMERSON. — A comparative study of the digestion of proteins and carbohydrates in goats during infusoria free and infected periods. *Proc. Nat. Acad. Sci. Washington*, 1929, t. 15.
- BECKER, SCHULZ, EMMERSON. — Experiments on the physiological relationships between the stomach infusoria of Ruminants and their hosts. *Ia. St. Coll. Journ. Sci.*, 1930, t. 4.
- BECKER and TALBOTT. — The Protozoan fauna of the rumen and reticulum of american cattle. *Ia. St. Coll. Journ. Sci.*, 1927, t. 1.
- BECKWITH et ROSE. — Digestion de la cellulose par les organismes de l'intestin de Termite. *Proc. Soc. exper. Biol. et Med.* 1929, t. 27, p. 4.
- BERGMAN (P.). — Studien über die Digestion der Pflanzenfresser. *Skand. Arch. Physiol.*, 1906, t. 18, p. 119.
- BOJANOWSKY (R.). — Zweckmässige Neuerungen für die Herstellung eines Kieselsäure Nährbodens und einige Beiträge zur Physiologie aerober Zelluloselöser. *Centralbl. f. Bakt.*, 1295, t. 114, p. 222.
- BOJANOWSKY (R.). — Ueber eisenbedürftige Zellulosegestörende Bakterien. *Zentralbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1933, t. 88, p. 1.
- BRADLEY (L. A.) and RETTGER (L. F.). — Studies on aerobic bacteria comm-

- only concerned in the decomposition of cellulose. *Journ. of Bact.*, 1927, t. 13, p. 321.
- BRANDT. — Beiträge zur Biologie der Infusorien im Digestiontractus der Herbivoren. *Inaug.-Diss.*, Bern, 1909.
- BUNDLE (A.). — Ciliate Infusorien im Cæcum des Pferdes. *Z. f. Wiss. Zool.*, 1895, t. 60, p. 284.
- CAULLERY (M.). — *L'évolution*. Paris, Payot, éditeur, 1931.
- CERTES. — Notes sur les microorganismes de la panse des Ruminants. *Bull. Soc. Zool.*, France, 1889, t. 14.
- CHOUKEVITCH (J.). — Flore bactérienne du gros intestin du cheval. *Ann. Inst. Pasteur*, 1911, t. 25, pp. 247, 345.
- CHOUKEVITCH (J.). — La flore microbienne du gros intestin des Bovidés. *Ann. Inst. Pasteur*, 1913, pp. 246, 307.
- CLAUSEN (P.). — Studien über anaerobic Zellulosebazillen unter besonderer Berücksichtigung der Züchtungstechnik. *Centralbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1931, t. 84, p. 20.
- CLEVELAND (L. R.). — The physiological and symbiotic relationships between the intestinal protozoa of Termites and their host, with special reference to *Reticulitermes flavipes* Kollar. *Biol. Bull.*, 1924, t. 46, p. 177.
- CONN (H.). — A possible function of actinomyces in the soil. *N. Y. Agric. Exper. Stat. Tech. Bull.*, 1916, t. 52.
- CONN (H.). — The microscopic study of bacteria and fungi in the soil. *N. Y. Agric. Exper. Stat. Tech. Bull.*, 1918, t. 64.
- CONN (H.). — A microscopic method for demonstrating fungi and actinomyces in soil. *Soil Sci.*, 1922, t. 14, p. 149.
- COSTE (M.). — Développement des Infusoires ciliés dans une macération de foin. *C. R. Acad. Sci.*, 1884, t. 59, p. 149.
- COWLES. — Cellulose decomposition by anaerobic bacteria. *J. of Bact.*, 1930, p. 15.
- COWLES and RETTGER. — Isolation and study of an apparently wide spread cellulose-fermenting anaerobie, *Cl. celluloso solvens* (n. sp.). *Journ. of Bact.*, 1931, t. 21.
- CROWTHER-WOODMAN. — *J. of Agric. Sci.*, 1917, t. 8, p. 429.
- DE BARY (A.). — Ueber einige Sclerotinien und Sclerotienkrankheiten. *Bot. Zeit.*, 1886, 44, p. 409.
- DOGIEL. — Cellulose als Bestandteil des Skeletts bei einigen Infusorien. *Biol. Zentralbl.*, 1923, Bd. 43.
- DOGIEL. — Ueber die Art der Nahrung und der Nahrungsaufnahme bei den in Darm der Huftiere parasitierenden Infusorien. *Trav. de la Soc. Nat. de Leningrad*, 1925, t. 54.
- DOGIEL. — Monographie der Familie Ophryoscolecidae. *Arch. f. Protistenk.*, 1927, Bd. 59.
- DOGIEL. — Experimente über die Ernährungsphysiologie der Infusorien. *Int. Cong. Zool.*, 1929, t. 10.
- DOGIEL. — Biologische Notizen über Darminfusorien der Huftiere. *Arch. Russ. de Prot.*, 1929, Bd. 8.
- DOGIEL und FEDOROWA. — Ueber den Bau und die Funktion des inneren Skeletts der Ophryoscoleciden. *Zool. Anz.*, 1925, Bd. 62.
- DOGIEL und FEDOROWA. — Ueber die Zahl der Infusorien im Wiederkäuermagen. *Zentralbl. f. Bat., Orig.*, 1929, Bd. 112.
- DOGIEL und FEDOROWA. — Experimentelle Untersuchungen zur Biologie der

- Infusorien des Wiederkäuermagen. *Wiss. Arch. f. Landwirtschaft*, 1930, Bd. 3, H. 1.
- EERLEIN. — Ueber die im Wiederkäuermagen vorkommenden Infusorien ciliaten. *Zeitschr. f. wiss. Biol.*, 1895, Bd. 59.
- EDWARDS. — Remarque sur la communication de COSTE (developpement des infusoires ciliés dans une macération de foin. *C. R. Acad. Sci.*, 1864, t. 59, p. 155.
- ELLENBERGER (W.). — Zur Frage der Zelluloseverdauung. *Zeit. Physiol. Chem.*, 1915, t. 96, p. 237.
- ELLENBERGER-WAENTIG. — Neue Versuche mit Holz. *Berl. tier. Woch.*, 1918, t. 34, p. 493.
- ENZMANN. — Kritische Betrachtungen über die gegenwärtigen Verfahren, die Wissenschaft von der Ernährung tierischen Organismen von Standpunkte der neuligen organischen Chemie zu rektifizieren, anknüpfend an Produktionsfütterungen der Schafe. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1866, t. 8.
- FERBER (K. E.). — Die Zahl und Masse der Infusorien im Pansen und ihre Bedeutung für den Eiweissaufbau beim Wiederkäuer. *Zeit. f. Tierzüchtg. u. Züchtungs-biol.*, 1928, Bd. 12, p. 31.
- FERBER (K. E.). — Die Veränderung der Infusorienzahl im Pansen der Wiederkäuer im Zusammenhang mit der Veränderung des Eiweissumsatzes. *Zeit. f. Tierzüchtg. u. Züchtungs-biol.*, 1929, Bd. 15, p. 375.
- FERBER und WINOGRADOWA FEDOROWA. — Zählung und Teilungsquote der Infusorien im Pansen der Wiederkäuer. *Biol. Zbl.*, 1929, Bd. 49, p. 327.
- FIEBIGER. — Die tierrischen Parasiten der Haus und Nutztiere sowie des Menschen. Leipzig, 1923, p. 124.
- FRED, PETERSON, VILJEN. — The fermentation of cellulose by thermophilic bacteria. *Abstracts Bacteriol.*, 1924, t. 8, p. 4.
- GODDEN (W.). — Digestibility of cellulose (straw) after treatment with soda. *J. of agric. Sci.*, 1920, t. 10.
- GREY and CHALMERS. — On the stimulating action of certain organic compounds on cellulose decomposition by means of a new aerobic microorganism that attacks both cellulose and agar. *Ann. Applied Biology*, 1924, t. 11, p. 324.
- GRÖNEWEGE (I.). — Untersuchungen über die Zersetzung der Zellulose durch aerobe Bakterien. *Centralbl. f. Bakt. (Ref.)*, 1924, t. 53, p. 414.
- GRÖNEWEGE (I.). — Recherche sur la dégradation de la cellulose par les bactéries aérobies. *Med. Alg. praefstation voor d. Landbow.*, Batavia, 1923, n° 13.
- GRUBY et DELAFOND. — Sur les animalcules se développant dans l'estomac et dans les intestins pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *C. R. Acad. Sci.*, 1843, t. 17.
- GUNTHER. — Untersuchungen über die in Magen unserer Hauswiederkäuer vorkommenden Wunper Infusorien. *Zeitschr. f. wiss. Biol.*, 1899, Bd. 65.
- GUYENOT (E.). — L'Hérédité, l'Evolution. Paris (Doin).
- HAIGH (L. D.). — A suggested modification of the method for crude fiber. *J. of Ass. off. agric. Chem.*, 1920, t. 4, p. 336.
- HAUBNER. — *Zeitschr. f. deut. Landwirte*, 1855.
- HENNEBERG-PFEIFFER (Th.). — Ueber den Einfluss eines einseitig gesteigerten Zusatzes von Eiweissstoffen zum Beharrungsfutter auf den Gesamtstoffwechsel des ausgewachsenen Thieres. *J. f. Landw.*, 1890, p. 215.
- HENNEBERG (W.) und STOHMANN. — *J. f. Landw.*, 1859, p. 361.

- HOFMEISTER (V.). — Fütterungsversuche mit Schafen. *Landw. Versuchsstat.*, 1864, t. 6, p. 185.
- HOFMEISTER (V.). — Fütterungsversuche mit Merinos- und Southdown-Frankenhämmeln. *Land. Versuchsstat.*, 1866, t. 8, p. 351.
- HOFMEISTER (V.). — Fütterungsversuche mit Schafen. *Landw. Versuchsstat.*, 1869, t. 11, p. 244.
- HOFMEISTER (V.). — Ueber Celluloseverdauung. *Arch. f. wiss. u. prakt. Thierh.*, 1881, t. 7, p. 169.
- HOFMEISTER (V.). — Die Rohfaser und einige Formen der Zellulose. *Land. Jahrb.*, 1888, t. 17, p. 329.
- HOPFLE (A.). — Ueber bisher unbekannten, celluloselösenden, im Verdauungstraktus vorkommenden Aspergillus, « *Aspergillus cellulosa* », seine Züchtung und seine Eigenschaften. *Zentralbl. f. Bakt., Orig.*, 1919, t. 83, p. 531.
- HOPFLE (A.). — Bacteriologische Untersuchungen über die Zelluloseverdauung. *Zentralbl. f. Bakt., Orig.*, 1919, t. 83, p. 324.
- HÖSSLIN und LESSER. — Ueber die Zersetzung der Zellulose durch den Inhalt des Cecums des Pferdes. *Z. f. Biol.*, 1910, t. 54, p. 47.
- HUTCHINSON and CLAYTON. — On the decomposition of cellulose by an aerobic organism (*Spirochaeta cytophaga*). *Journ. of Agricult. Sci.*, 1919, t. 9, p. 143.
- KELLERMAN (K. F.). — The secretion of a cytase by *Penicillium pinspillum*. *U. S. D. A. Bur. Pl. Ind. Cir.*, 1913, t. 118, p. 29.
- KELLERMAN (K. F.) and Mc BETH. — The fermentation of cellulose. *Centrbl. Bakt.*, 1912, t. 34, p. 485.
- KELLERMAN (K. F.), Mc BETH and SCALES. — Identification and classification of cellulose-dissolving bacteria. *Centralbl. f. Bakt.*, 1913, t. 39, p. 502.
- KELLNER. — *Landw. Vers. Stat.*, 1900, t. 53, p. 1.
- KHOUVINE (Y.). — Digestion de la cellulose par la flore intestinale de l'homme. *B. cellulosa dissolvens. Ann. Inst. Pasteur*, 1923, t. 37, p. 711.
- KHOUVINE (Y.). — Le *Bacillus cellulosa dissolvens* et la fermentation de la cellulose. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, t. 94, p. 1072.
- KHOUVINE (Y.). — Cellulose et bactéries. Décomposition et synthèse. *Actualités Scientif. et Industr. (Hermann)*, 1934.
- KNOTH. — Neue Versuche zur Züchtung der im Pansen von Wiederkäuern lebenden Ophryoscoleciden (Ciliata). *Zeit. f. wiss. Biol.*, 1928, t. 1.
- KRAINSKY. — Die Actinomyceten und ihre Bedeutung in der Natur. *Centralbl. f. Bakt.*, 1913, t. 36, p. 339.
- KUHN, ARONSTEIN et SCHULZE (H.). — Berichte über die auf der landwirtschaftlichen Versuchsstation Weende ausgeführten Versuche. *J. f. Landw.*, 1866.
- KUHN und FLEISCHER. — Versuche über die Ausnutzung des blühenden Rothklee's als Grünfutter und als Heu, ausgeführt an der. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1869, t. 11, p. 177.
- LEGROUX et KEMAL-DJEMIL. — Sur la lyse transmissible. *C. R. Acad. Sci.*, 1932, t. 194, p. 319.
- LEHMANN-VOGEL. — Ueber die Verdaulichkeit von Wiesenheu, Bohnenschrot, Gerssenschrot, Stückrüben und Reisfuttermehl. *J. f. Landw.*, 1890, p. 165.
- LIEBETANZ. — Die parasitischen Protozoen des Wiederkäuermagens. *Arch. f. Protistenk.*, 1910, Bd. 19.

- LOHNIS und LOCHHEAD. — Ueber Zellulose-Zersetzung. *Zentralbl. f. Bakt.*, 1913, t. 37, p. 490.
- LWOFF (A.). — Recherches biochimiques sur la nutrition des Protozoaires. *Monographie de l'Inst. Pasteur, Paris*, 1932.
- LYMN-LANGWELL. — Action of bacteria on cellulosic material. *Journ. Soc. chem. Indust.*, 1923, t. 42, p. 280.
- Mc BETH. — Studies of the decomposition of cellulose in soil. *Soil Sci.*, 1916, t. 4, p. 437.
- Mc BETH and SCALES. — The destruction of cellulose by bacteria and filamentous fungi. *U. S. Dept. Agric. Bur. Plant Ind. Bull.*, 1913, p. 266.
- MAC COY and PETERSON. — The use of pectin in fermentation tests. *J. of Infect. Dis.*, 1928, t. 43, p. 475.
- MAC FAYDEN and BLAXALL. — Thermophilic bacteria. *Transact. of the Jenner Inst.*, 1899, Sér. II, p. 162.
- MALLEVRE. — Der Einfluss der als Gärungsprodukte der Cellulosegebildeten Essigsäure auf den Gaswechsel. *Archiv f. ges. Phys.*, 1891, t. 49, p. 460.
- MANGOLD. — Neue Untersuchungen über die Verdauung der Wiederkäuer. *Naturwissenschaften*, Berlin, 1928, t. 16.
- MANGOLD. — Handbuch der Ernährung und des Stoffwechsels der landwirtschaftlichen Nutztiere. 2-157-Berlin, Julius Springer, 1929.
- MANGOLD und SCHMITT-KHRAMER. — Die Stickstoffverteilung im Pansen der Wiederkäuer bei Fütterung und Hunger und ihre Beziehung zu den Pansen-Infusorien. *Biochem. Zeit.*, 1927, t. 191, p. 417.
- MANN. — Zur Zellulosebestimmung im Kothe. *Arch. f. Hyg.*, 1899, t. 36, p. 158.
- MARCHAL (J. G.). — Variation et mutation en bactériologie. Paris, Le François, 1932.
- MARGOLIN (S.). — Methods for the cultivation of cattle ciliates. *Biol. Bull.*, 1930, t. 59, p. 301.
- MEYER (R.). — Beiträge zur Kenntnis der Cellulosezersetzung unter niedrigerer Sauerstoffspannung. *Arch. f. Mikrobiol.*, 1934, t. 5, p. 185.
- MOWRY and BECKER. — Experiments on the biology of infusoirs in the rumen of goats. *Iowa St. Col. of Sci.*, 1930, t. 5, p. 35.
- MUNCK. — *Arch. ges. Physiol.*, 1890, t. 46, p. 322.
- OMELIANSKY (V.). — Sur la fermentation de la cellulose. *C. R. Acad. Sci.*, 1895, t. 121, p. 653.
- OMELIANSKY (V.). — Sur un ferment de la cellulose. *C. R. Acad. Sci.*, 1897, t. 125, p. 970.
- OMELIANSKY (V.). — Sur la fermentation de la cellulose. *C. R. Acad. Sci.*, 1897, t. 125, p. 1431.
- OMELIANSKY (V.). — Ueber die Zellulosegärung. *Centralbl. f. Bakter.*, 1902, t. 18, plusieurs travaux.
- OMELIANSKY (V.). — Ueber die Trennung der Wasserstoff- und Méthan-Gärung der Zellulose. *Centralbl. f. Bakter.*, 1903, t. 11, p. 703.
- OMELIANSKY (V.). — Die histologischen und chemischen Veränderung der Leinstergel unter Einwirkung der Mikroben der Pektin- und Zellulosegärung. *Centralbl. f. Bakter.*, 1904, t. 12, p. 33.
- OMELIANSKY (V.). — Zur Frage der Zellulosegärung, *Centralbl. f. Bakter.*, 1913, t. 36, p. 472.
- POCHON (J.). — Sur une bactérie cellulolytique isolée de la panse des Ruminants. *Soc. Biol.*, 1933, t. 113, p. 1323.
- POCHON (J.). — Influence du milieu de culture sur les propriétés biologiques

- d'une bactérie de la panse du bœuf. *C. R. Acad. Sci.*, 1934, t. 198, p. 1808.
- POCHON (J.). — Etude biologique comparée du contenu de la panse du bœuf et du milieu au liquide de panse pour la culture du *Plectridium cellulyticum* (POCHON, 1933), *Soc. Biol.*, 1934, t. 116, p. 327.
- POCHON (J.). — Sur le rôle d'une bactérie de la panse, dans la transformation de la cellulose en glucose, à l'intérieur du tube digestif des Ruminants. *C. R. Acad. Sci.*, 1934, t. 199, p. 983.
- POUCHET (F.-A.). — Réponse aux observations de Coste. *C. R. Acad. Sci.*, 1884, t. 59, p. 276.
- PREVOT (A.-R.) Etudes de systématique bactérienne. *Ann. Sc. naturelles*, 1933, t. 15.
- PRINGSHEIM (H.) — Weiteres über die Verwendung von Cellulose als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffs. *Centralbl. f. Bakter.*, 1910, t. 26, p. 222.
- PRINGSHEIM (H.). — Ueber den fermentativen Abbau der Cellulose. *Zeit. physiol. Chem.*, 1912, t. 128, p. 266.
- PRINGSHEIM (H.) — Ueber die Vergärung der Zellulose durch thermophile Bakterien. *Centralbl. f. Bakt.*, 1913, t. 38, p. 513.
- PRINGSHEIM (H.) — Der biologische Abbau der Zellulose. *Angest. Bot.*, 1920, t. 2, p. 217.
- REICHENOW. — Den Wiederkauer-Infusorien verwandte Formen aus Gorilla und Schimpanze. *Arch. f. Protistenk.*, 1920, Bd. 41.
- RIPPEL und FLEHMIG. — *Arch. f. Mikrobiol.*, 1933, t. 4, p. 229.
- SACK (J.). — Zelluloseangreifende Bakterien. *Centralbl. f. Bakt.*, 1924, t. 112, p. 77.
- SANBORN (J. R.). — The china blue-aurin-cellulose medium for the physiological study of cellulose destroyers. *J. of Bact.*, 1927, t. 14, p. 395.
- SANBORN (J. R.). — Essential food substances in soil. *J. of Bact.*, 1927, t. 14, p. 113.
- SANBORN (J. R.). — Physiological studies on cellulose fermentation. *J. of Bact.*, 1928, t. 16, p. 315.
- SANBORN-HAMILTON. — The influence of *Azotobacter achroococcum* upon the physiological activities of cellulose destroyers. *J. of Bact.*, 1929, t. 18, p. 169.
- SARLES-FRED and PETERSON. — Some factors that influence the formation of products in the thermophilic fermentation of cellulose. *Zbl. f. Bakt.*, 1932, t. 135, p. 401.
- SCALES (F.). — The enzymes of *Aspergillus terricola*. *J. Biol. Chem.*, 1914, t. 19, p. 459.
- SCALES (F. M.). — Some filamentous fungi tested for cellulose destroying power. *Bot. Gaz.*, 1915, t. 60, p. 149.
- SCHALK. — Physiology of the ruminant stomach. *North Dakota Agr. Exper. Bull.*, 1928, n° 246.
- SCHELLENBERG (H. C.). — Untersuchungen über das Verhalten einiger Pilze gegen Hemisellulosen. *Flora*, 1908, t. 98, p. 257.
- SCHNEURER (A.). — Verdauung der Wirbeltiere. *Hand. d. Biochem. d. Menschen u. d. Tiere*, Oppenheimer, 1924.
- SCHNEURER (A.) — Einfluss der Mikroorganismen auf die Worgänge im Verdauungstractus bei Herbivoren. *Handb. d. norm. u. path. physiol.*, Berlin, 1927, t. 3.
- SCHNEURER (A.) und GRIMMER. — Zur Kenntniss der in den Nahrungsmitteln

- enthaltenen Enzyme und ihrer Mitwirkung bei der Verdauung. *Zeit. f. Physiol. Chem.*, 1906, t. 48, p. 27.
- SCHUEBERT-SCHIEBLICH. — Der Einfluss der Bakterien auf die Verdauungsvorgänge bei den Herbivoren. *Hand. d. norm. u. pathol. Physiol.*, 1927, 3.
- SCHUBERG. — Die Protozoen des Wiederkauermagens. I. Bütschlia-Protricha-Dasytricha-Entodinium. *Zool. Jahrb*, 1888, Bd. 3.
- SCHULZ. — Der Nachweis und die Verbreitung des Chitins, mit einem Anhang über das Komplizierte Verdauungssepteus der Aphrysoscolecidae. *Zeit. f. Morph. u. Okol. der Tiere*, 1924, Bd. 2.
- SCHULZE (F.). — Beitrag zur Kenntnis des Lignins. *Chem. Zentr.*, 1887, p. 321.
- SCOTT, FRED, PETERSON. — Products of the thermophilic fermentation of cellulose. *Ind. Eng. Chem.*, 1930, t. 22, p. 731.
- SIMOLA (P. F.). — Über den Abbau der Zellulose durch Mikroorganismen. Zur Morphologie und Physiologie der aeroben sporenbildenden Cellulose-Bakterien. *Ann. acad. Scient. Fennica*, ser. A, 1931, t. 34. Analyse par Winogradsky, in *B. Inst. Pasteur*, 1932, t. 30.
- SIMON-LOHRICH. — Eine neue Methode der quantitativen Zellulosebestimmung in Nahrungsmittel und Föces. *Zeit. physiol. Chem.*, 1904, t. 42, p. 55.
- SKINNER. — An explanation of the action of the so-called accessory substances in the association of *Azotobacter* and cellulose decomposing organisms. *Journ. of Bacter.*, 1930, t. 19.
- SNIESZKO. — The isolation of thermophilic fermenting bacteria. *Journ. of Bacter.*, 1932, t. 23, p. 71.
- STOHMANN. — Ueber die Ernährungsvorgänge des Milchproduzierenden Tieres. *Zeit. f. Biol.*, 1870, t. 6, p. 205.
- TAPPEINER (H.). — Die Gase des Verdauungsschlauches der Pflanzenfresser. *Zeit. f. Biol.*, 1883, t. 119, p. 228.
- TAPPEINER (H.). — Ueber der Gährung der Cellulose, insbesondere über deren Lösung im Darmkanale. *Zeit. f. Biol.*, 1884, t. 20, p. 52.
- TAPPEINER (H.). — Nachträge zu den Untersuchungen über die Gährung der Zellulose. *Zeit. f. Biol.*, 1888, t. 24, p. 105.
- TETRAULT. — The decomposition of cellulose in nature. *Proc. Indiana Acad. Sci.*, 1930, t. 39, p. 137.
- TETRAULT. — The growth of thermophilic decomposing cellulose organisms on agar. *J. of Bact.*, 1930, t. 19, p. 15.
- THOMAS K. PRINGSHEIM. — Die Verdaulichkeit der Zellulose. *Arch. f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1918, p. 25.
- TRIER. — Der Kohlehydratsstoffwechsel der Panseninfusorien und die Bedeutung der grünen Pflanzenteile für diese Organismen. *Z. vergl. Physiol.*, 1926, t. 45, p. 305.
- USUELLI. — Gli infusori ciliati che virono nell'apparato digerente degli erbivori. *La Clinica veterinaria* 1930.
- VAN ITERSOM. — Die Zersetzung von Zellulose durch aerobe Mikroorganismen. *Zbl. Bakt.*, 1904, t. 11, p. 689.
- VAN NIEL (C. B.). — The propionic acid Bacteria. *Haarlem*, 1928.
- VILJOEN FRED and PETERSON. — *J. of Agric. Sci.*, 1926, t. 16.
- VON KNIEREM. — *Z. Biol.*, 1885, t. 21, p. 135.
- WAKSMAN (S. A.). — Soil fungi and their activities. *Soil Sci.*, 1916, t. 2, p. 103.

- WAKSMAN (S. A.). — Cultural studies of species of Actinomyces. *Soil Sci.* 1919, t. 8, p. 74.
- WAKSMAN (S. A.) et CAREY (C.). — Milieux aux silicates pour la mise en évidence des bactéries attaquant la cellulose. *Journ of Bact.*, 1926, t. 12, p. 87.
- WAKSMAN (A.) et DUBOS (J.). — Nature des organismes qui décomposent la cellulose dans la terre arable. *C. R. Acad. Sci.*, 1927, t. 185, p. 1225.
- WAKSMAN-HECKELEKIAN. — Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility. Decomposition of cellulose. *Soil Sci.*, 1924, t. 17, p. 275.
- WAKSMAN and SKINNER. — Microorganisms of the decomposition of cellulose in the soil. *J. of Bact.*, 1926, t. 12, p. 57.
- WAKSMAN-STARKEY. — Influence of organic matter upon the development of fungi, actinomyces and bacteria in the soil. *Soil Sci.*, 1924, t. 17, p. 373.
- WEINECK. — Die chemische nature der Skelettsubstanzen bei den Ophryoscolinden. *Zeit. f. Naturw.*, 1931, t. 65.
- WEINECK (E.). — Die Celluloseverdauung bei den Ciliaten des Wiederkauermagens. *Arch. f. Protist.*, 1934, t. 82, p. 169.
- WEISKE (H.). — Versuche über etwaige Einflüsse, welche die Aufnahme freier Säure auf die Verdauungsvorgänge sowie auf den Stickstoff- und Mineralstoffumsatz im Körper der herbivoren ausübt. *J. f. Landw.*, 1886, p. 21.
- WEISKE, SCHULZE, FLEISCHIG. — Kommt der Cellulose eiweissparende Wirkung bei der Ernährung der Herbivoren zu? *Zeit. f. Biol.*, 1888, t. 24, p. 553.
- WERKMAN (Ch.) and STRITAR. — Thermophilie fermentation of beet-pulp. *J. of Bact.*, 1932, t. 18, p. 71.
- WERNER. — Der Erreger der Cellulose Verdauung bei der Rosenkäyer (potosca cuprea). *Zeit. f. Bakt.*, 1926, t. 67, p. 297.
- WILSING. — Ueber die Mengen der vom Wiederkauer in den Entleerungen ausgeschiedenen flüchtigen Säuren. *Zeit. f. Biol.*, 1885, t. 21, p. 625.
- WINOGRADOWA-FEDOROWA. — Zählungsversuch der Infusorien aus dem Wiederkäuermagen und deren Züchtung *in vitro*. *Trav. Soc. Nat. (Zool.)*. Leningrad, 1929, t. 59.
- WINOGRADOWA-FEDOROWA. — Zur Frage nach der Einwirkung der Panseninfusorien auf Verdauung der Wiederkäuer. *Centralbl. Bakt.*, Abt. II, 1930, t. 81.
- WINOGRADSKY (S.). — Sur l'étude microscopique du sol. *C. R. Acad. Sci.*, 1924, t. 179, p. 367.
- WINOGRADSKY (S.). — La méthode directe dans l'étude microbiologique du sol. *Chimie et Industrie*, 1924, t. 11, p. 215.
- WINOGRADSKY (S.). — Etude sur la microbiologie du sol. *Ann. Inst. Pasteur*, 1925, t. 39, p. 299.
- WINOGRADSKY (S.). — 1) Etude sur la microbiologie du sol. 1^{er} mémoire. *Ann. Inst. Pasteur*, 1926, 40, p. 299.
2) Sur les microbes fixateurs d'azote. 2^e mémoire. *Ibid.*, p. 435.
- WINOGRADSKY (S.). — Principes et microbiologie du sol. *Ann. Inst. Pasteur*, 1927, t. 41, p. 1126.
- WINOGRADSKY (S.). — Dégradation de la cellulose dans le sol. *C. R. Acad. Sci.*, 1927, t. 184, p. 493.
- WINOGRADSKY (S.). — Etude sur la bactériologie du sol. Pouvoir fixateur. 3^e mémoire. *Ann. Inst. Pasteur*, 1928, t. 42, p. 36.
- WINOGRADSKY (S.). — Notes sur un travail de Gray (*cytophaga*). *Ann. Inst. Pasteur*, 1929, t. 42.

- WINOGRADSKY (S.). — Etude sur la microbiologie du sol. 4^e mémoire. *Ann. Inst. Pasteur*, 1929, t. 43, p. 349.
- WINOGRADSKY (S.). — Analyse microbiologique du sol. 1^{er} Congrès intern. de Microb., Masson, 1930.
- WINOGRADSKY (S.). — Décomposition aérobie de la cellulose par les bactéries. *Bull. Inst. Pasteur*, 1932, t. 30, p. 369.
- WINOGRADSKY (S.). — Analyses des travaux récents sur la décomposition aérobie de la cellulose par les bactéries. *Bull. Inst. Pasteur*, 1932, t. 30.
- WOLLMAN (E.). — Bactériophagie (autolyse hérédocontagieuse) et Bactériophages (facteurs lysogènes). *Bull. Inst. Pasteur*, 1934, t. 32, p. 945.
- WOLLMAN (Eug.) et WOLLMAN (El.). — Sur la transmission parahéréditaire des caractères chez les bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, t. 93, p. 1568.
- WOODMAN-HANLEY. — *J. of Agric. Sci.*, 1926, t. 16, p. 24.
- WOODMAN-AMOS. — *J. of Agric. Sci.*, 1928, t. 18, p. 194.
- WOODMAN. — *J. of Agric. Sci.*, 1922, t. 12, p. 144.
- WOODMAN-BLUNT-STEWART. — *J. of Agric. Sci.*, 1926, t. 16, p. 205.
- WOODMAN-NORMAN-BEE. — *J. of Agric. Sci.*, 1928, t. 18, p. 266.
- WOODMAN-CARLTON. — *J. of Agric. Sci.*, 1928, t. 18, p. 544.
- WOODMAN-BEE. — *J. of Agric. Sci.*, 1927, t. 17, p. 477.
- WOODMAN-STEWART. — *J. of Agric. Sci.*, 1928, t. 17, p. 713.
- WOODMAN-STEWART. — Non publié, signalé dans le travail suivant.
- WOODMAN. — The role of cellulose in nutrition. *Biol. Reviews*, 1930, t. 5.
- ZUNTZ-MEHRING. — *Arch. ges. Physiol.*, 1883, t. 46, p. 173
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.	Pages 1
PREMIÈRE PARTIE	
CHAPITRE PREMIER. — <i>Digestibilité de la cellulose</i>	5
CHAPITRE II. — <i>Mécanisme biologique de la digestion de la cellulose</i>	9
I. — Rôle des Champignons et Actinomycètes	10
II. — Rôle des Infusoires	13
III. — Rôle des Bactéries	18
A. — Flore bactérienne de la panse.	19
B. — Flore bactérienne du sol	21
a) Aérobie.	22
b) Anaérobies	23
c) Thermophiles	26
C. — Interréactions bactériennes.	27
CHAPITRE III. — <i>Mécanisme de la nutrition</i>	30
I. — Valeur énergétique de la cellulose.	30
II. — Valeur énergétique des acides acycliques	31
III. — Transformation de la cellulose en glucose	32
DEUXIÈME PARTIE	
CHAPITRE PREMIER. — <i>Isolement d'une bactérie cellulolytique de la panse</i>	35
I. — Isolement.	35
II. — Description de la bactérie	39
III. — Facteurs nécessaires à la cellulolyse	43
IV. — Modifications adaptatives de <i>Pl. Cellulolyticum</i>	50
CHAPITRE II. — <i>Métabolisme comparé de la fermentation in vivo et in vitro</i>	58
I. — Métabolisme <i>in vivo</i>	58
II. — Métabolisme <i>in vitro</i>	59
CHAPITRE III. — <i>Formation de sucres réducteurs in vitro. Cellulase</i>	71
I. — Mise en évidence d'une cellulase	71
II. — Rôle des variations de pH dans la formation du glucose	74
CHAPITRE IV. — <i>Rôle de Pl. cellulolyticum dans la digestion de la cellulose</i>	78
CHAPITRE V. — <i>Essais sur le rôle des Infusoires</i>	82
CONCLUSIONS	

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Les cellulases dans la série animale.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 6 mars 1935.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

CHARLÉTY.

